

Efeitos agudos do ferro (II) sobre a contratilidade miocárdica do rato

Renata Andrade Ávila

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, 2016

Efeitos agudos do ferro sobre a contratilidade miocárdica do rato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Leonardo dos Santos
(PPGCF/UFES/ES)

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, ES

2016

Ávila, Renata Andrade 1990

**Efeitos agudos do ferro (II) sobre a contratilidade miocárdica do rato.
[Vitória] 2016**

72 p, 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2016)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,
Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Orientador: Profº. Drº. Leonardo dos Santos

1. Sobrecarga de Ferro 2. Contratilidade miocárdica 3. Estresse Oxidativo 4.
ATPase miosínica 5. Responsividade ao cálcio

Aos meus.

“Que a Ciência lhes seja alegre, como empinar papagaios.”

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer que não se conseguiria sozinho e, por isso, agradeço.

A Deus que encheu a vida de ‘pequenas felicidades certas’ e me ensinou como ‘olhar para vê-las assim’.

Ao professor Leonardo dos Santos. Orientador e colega de trabalho. Por ter assumido o projeto de risco que era me orientar. Por ter me incentivado com tanta firmeza e me corrigido com tanta delicadeza. Pela disponibilidade infinita, por olhar tão longe e por nunca se cansar. Pelo conhecimento compartilhado e os conselhos dados. Pela preocupação, o cuidado, o café dividido, os artigos deixados na gaveta. E pela confiança, muito obrigada pela confiança. Seu jeito de não tratar o trabalho de forma impessoal, os sábados e domingos que você passou trabalhando mesmo com minha conversa e risada durante as intermináveis estabilizações do papilar me serviram de grande exemplo. Mais ainda, de grande incentivo: aprendi que realmente é possível continuar gostando do trabalho e se empolgando com ele, mesmo após alguns anos na lida.

Aos professores do LEMC: Dalton, Ivanita, Alessandra e Paula. A minha gratidão pela receptividade, por me ensinarem tanto e pela convivência nestes anos. Vocês contribuíram para a minha formação e se tornaram minhas referências. Iva, obrigada em especial por ter aberto as portas do laboratório para mim. Pelo carinho e atenção com que me tratou desde o nosso primeiro contato. Nada seria possível sem você.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, por todos os ensinamentos, que por vezes, extrapolaram a Ciência.

Ao professor Fogaça, professora Ilana e o doutorando João da UFPR, pela receptividade, atenção e empenho para a realização dos experimentos. E também pela acolhida carinhosa e pela ajuda na fase de compreensão dos resultados.

Aos professores Marcelo Perim Baldo, Danilo Sales Bocalini e André Leopoldo, por aceitarem tão prontamente o convite para avaliação deste trabalho.

Aos funcionários da UFES que mais que desempenharem suas funções, tornaram algumas tarefas mais fáceis. Anderson, pelas soluções, pelos cafés, pelas conversas e pelas mangas; Dani, por fazer ginástica com a agenda do microscópio e do criostato e pela alegria e ajuda com que sempre é possível contar; Rodolfo, João e Amarildo por estarem sempre dispostos a ajudar e resolver os problemas que apareciam, às meninas da limpeza pelo capricho, especialmente à Marli, pelo carinho e por cuidar dos meus resfriados e dor de dente.

À minha família, tão grande e tão minha. Pai e mãe, obrigada por tudo: pelo esforço de me ver feliz, por compreenderem minha ausência, por andarem longe para matar a saudade, por bagunçar a rotina quando estou em casa, pela comida planejada para me agradar, pela ajuda, pelo amor que sempre foi farto e pela empolgação pelas minhas aventuras. Sem tudo isso, teria sido muito difícil realizá-las. Fabíola, “fia”, obrigada pela conversa de todo dia, por fazer eu me sentir perto, por não me poupar as novidades e contar quase em tempo real. Obrigada por ser a pupila mais carente e carinhosa do mundo! Vó, minha mocinha, obrigada por não me “adultecer”, pelo cafuné, pelo mimo e pelas orações. Sempre contei com tudo isso e amo muito vocês!

A todos os meus tios. Especialmente à tia Dedé e tio Jr pelas caronas BH-São João, pelo pão de sal no café, pela moqueca inesperada e pela disponibilidade de sempre; tio Camilo, obrigado pelo xodó, pela preocupação, pela felicidade de me ver, pelo carinho tão grande e pelo queijo sempre fresquinho me esperando; tio Lelei, pelas risadas que me arranca, pelas passadinhas rápidas só pra me ver, pelo orgulho que tem de mim; tia Amélia porque mesmo longe sempre parece que está perto. Tia Marilaine, pelo carinho que nunca cansou de demonstrar, tia Vaninha, por sempre cuidar de me deixar arrumadinha com seus presentes.

Aos meus primos. Impossível listá-los aqui, mas de coração, obrigada! A alguns é preciso dizer: André, porque primo é parente e presente. Thaís, por dividir o quarto, o banco, a mala, o lanche e o gosto musical. Camila, por dividir a vida toda comigo e por ter dividido ainda mais nestes últimos dois anos. E por alegrar minha vida com a Ana Júlia, o bebê mais legal do mundo. Fernanda,

por me “colocar pra frente” e por não me deixar perder nada na vida do Lorenzo, pelas fotos exclusivas e as visitas sempre cheias de tantas risadas.

Aos meus amigos.

Aos de sempre. Natália, Kellen, Mara, amigas da vida inteira, que sempre foram importantes, mas nos últimos dois anos, essenciais. Obrigada pelos ajustes na programação dos feriados porque eu estava chegando, por continuarem dividindo as alegrias e as peijas, pela ajuda, ainda que virtual, nesse tempo de distâncias. Obrigada por ser minha certeza, meu apoio, minha diversão. Obrigada por estarem por perto, mesmo longe. Thiago e Bill, queridos agregados, muito obrigada a vocês também.

Marina e Vinicius, meus queridos, porque com vocês as coisas nunca mudam. Pela conversa à toa, as visitas, as risadas, os mimos. Obrigada!

Aos presentes que a Biologia me deu: “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim, dividir um planeta e uma época com vocês.” Sete anos de amizade, risos (ah, os risos), choro, apego, brigas, sonhos compartilhados, realidades também. Obrigada por terem ficado adultos junto comigo, por dividirem as agonias nestes dois anos, por brigarem comigo quando eu amolecia, por me incentivarem quando eu estava cansada, por ouvirem minhas reclamações e por ficarem felizes comigo cada vez que eu fiquei. Obrigada por me ajudarem com a tarefa de ter saído de casa velha. Por terem sido tão bons faladores e os melhores ouvintes. Júlia, Nathália, Carlos, Victor, Igor, Luciana, Jéssica, Vanessa, Ludmila, Andreza, Débora, Sílvia, Felipe, vocês são parte desse mestrado!

Ricardo, meu grande irmão, obrigada por tudo! Mas tudo mesmo: de me ensinar a trocar resistência de chuveiro pelo telefone até andar a pé comigo pra casa de madrugada e no frio. Pelas comidas deliciosas, por me fazer rir até a barriga doer, por me dar uma luva pra cada um ficar com uma mão quente e outra fria, por se preocupar se estou me divertindo. E pelos carnavais, porque nem todos tem fim!

Ao pessoal cafeinado do LACBM/UFSJ. Na minha memória tão cheia, vocês ocupam um dos lugares mais bonitos. Todas as gerações que vibraram quando

eu vim explorar novas realidades, que filmaram e fotografaram cada equipamento novo que chegou, as reformas, as rãs, as gambiarras, os aniversários. Ah gente, obrigada pelo meu cafesta de aniversário à distância! Vocês são incríveis!

Aos meus queridos Luciano, Iara, Álvaro e Paola. Por acumularem funções na minha vida, me divertirem tanto, pelas conversas e cafés sem fim, pelos devaneios que vararam a noite. Por fazerem parte da minha vida de verdade. Pelos mimos, pelos socorros. Muito obrigada por me deixarem falar, sobre tudo e por muito tempo. E, meus pequenos, por me alegrarem tanto, pelos ataques de amor e por encherem minha vida de fofura, gargalhada e carinho. Amo vocês!

Li uma vez que ansiedade boa para o coração é a de quando gente querida desembarca na sua cidade. Natália, Júlia, Igor, Jober, Jéssica, Victor e Felipe, vocês foram como chuva no meio de uma tarde quente. Obrigada por terem aparecido nas bandas do Espírito Santo!

Aos capixabas. Esses que trabalham, confiam e me amparam sempre.

Nathália, Karla e Gabi, minha família de cá. Obrigada por fazer da casa um lar, pelo cuidado, preocupação, pela ajuda. Por me aceitarem e se divertirem com meu jeito. Pelas caronas, marmitas, cinema, show, teatro direto do serviço. Eu sempre posso contar com vocês, mesmo que seja pra comer enquanto eu falo sem parar. Não consigo nem imaginar como eu faria sem vocês. Obrigada, de coração.

Aos colegas do LEMC, que fazem do nosso laboratório esse ambiente de trabalho tão único. Todos, em algum momento, me ajudaram e por isso, minha gratidão imensa. Alguns extrapolaram a amizade do trabalho e marcaram minha estadia e meu caminho no mestrado.

Aos “dos Santos”, este grupo heterogêneo, louco e animado. Tati, porque você é muito mais que uma boa companheira, é uma boa amiga. Emily, por ter sido um anjo tantas vezes. E outras, nem tão anjo assim. Pri, obrigada pela sinceridade, torcida e companhia. João, obrigada por tanto companheirismo. Helbert, Nay e Fernando, obrigado por me deixarem repassar o pouco que eu

sei e por aprenderem com leveza, mesmo que seriamente. Vinicius, Rodrigo, Susana e Sabrina, obrigada pelas risadas e por aceitarem meu humor no dia-a-dia.

Marito, meu protetor, se eu fosse listar todos os motivos pelos quais te agradeço não ia acabar nunca. Pela parceria profissional de sucesso e pela parceria pessoal que segurou minhas inseguranças, que me fez companhia quando eu estava sozinha e que também me disse verdades necessárias. Não encontro outra palavra para te descrever, então: obrigada, amigo!

Gilson e Camila, obrigada pela paciência, carinho e por tudo que me ensinaram. Dentro e fora do laboratório. Vocês são cientistas e pessoas incríveis!

Bruna Azevedo, obrigada pela acolhida, por ter aberto as portas da casa e do coração para mim e por dividir pequenas alegrias lindas comigo. Maylla, obrigada por tudo que você fez nos meus primeiros meses aqui. Por ter me deixado chorar, me ensinado muitas coisas e ter feito até sopa! Guardo essas lembranças com muito carinho.

Paula, por ter dividido muito mais que o espaço do coração comigo. Você foi porto seguro, café dividido, conversa leve quando o cansaço era muito, risada por pouca coisa. E você é mãe, obrigada por usar seu instinto maternal com a gente que te cerca.

Bruninha, minha amora ciumenta. Obrigada por se importar tanto com a minha felicidade, por cuidar de mim, por se preocupar. Obrigada por me enxergar com esses olhos que me melhoram, pela admiração que você dispensa comigo e por ser tão boa amiga. Que bom que eu tenho você! Bia, em dias de tristeza ou de alegria, estar com você era risada certa. Obrigada por cada gargalhada que você arrancou de mim. Wena, cada lanche dividido em silêncio, cada noite adentrada no laboratório, cada mensagem de desespero ou de ajuda, cada cerveja, significaram muito mais que isso. Por amenizar tanto a solidão e por ser responsável pelas histórias mais desconexas, muito obrigada, bonita!

Elis e Divo, muito obrigada por tanta amizade. Pela acolhida, as caronas, os desabafos que vocês não cansaram de ouvir. Pelo chope, a preocupação, o

cuidado. Pelas conversas sérias e pela quantidade enorme de bobagens. Por tudo isso dentro e fora dos limites da Pós Graduação.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação, em especial Eduardo, Layla, Jamila, Brunela, Cléo, Marquinho, Vinicius, Gírlândia, Victor e Sandra pelas risadas e pelas ajudas.

A todos que me incentivaram, me ajudaram, me descansaram e me distraíram durante esse tempo e, que com isso, certamente colaboraram muito comigo, meu sincero agradecimento.

A CAPES e ao CNPq, pelos recursos financeiros para desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Ferro.....	18
1.1.1 Aspectos gerais.....	18
1.1.2 Cinética do ferro no organismo.....	19
1.1.3 Ferro e estresse oxidativo.....	23
1.1.4 Sobrecarga de ferro.....	24
1.1.5 Modelos experimentais de sobrecarga de ferro.....	27
1.1.6 Ferro e mecânica miocárdica.....	28
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivos específicos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Animais.....	33
3.2 Protocolos experimentais.....	33
3.2.1 Análise da mecânica miocárdica “in vitro”.....	33
3.2.2 Avaliação do estresse oxidativo miocárdico.....	42
3.2.2.1 Efeitos de antioxidantes sobre os parâmetros funcionais da contratilidade do músculo papilar.....	42
3.2.2.2 Avaliação da concentração de $O_2^{\cdot-}$ pela técnica de fluorescência de dihidroetideo.....	44
3.2.2.3 Avaliação da concentração de OH^{\cdot} pela técnica de fluorescência de hidroxifenil fluoresceína.....	45
3.2.3. Análise “in vitro” da atividade da enzima ATPase miosínica.....	46
3.3. Drogas e Reagentes	43

3.4. Análise estatística.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Efeitos agudos da administração de diferentes concentrações de Fe^{2+} sobre a contratilidade miocárdica.....	46
4.2 Avaliação do envolvimento das EROs nos efeitos agudos do Fe^{2+} sobre a contratilidade miocárdica.....	48
4.3 Avaliação da produção <i>in situ</i> de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}	51
4.4 Efeitos agudos da administração de Fe^{2+} sobre a atividade da ATPase miosínica.....	52
4.5 Efeitos agudos da administração de Fe^{2+} sobre a sensibilidade miofilamentar ao Ca^{2+}	53
5 DISCUSSÃO.....	54
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7 REFERÊNCIAS.....	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

[Fe]:Concentração de ferro

OH[•]: Radical hidroxila

ANOVA: Análise de Variância

CEUA: Comissão de Ética em Uso de Animais

DHE: Dihidroetídio

DMT1:Transportador de metal divalente 1

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HCP1: Proteína transportadora heme-1

HH: Hemocromatose hereditária

HFE: gene relacionado à hemacromatose hereditária

O₂^{•-}: Ânion superóxido

PKA: Proteína cinase A

PLB: Fosfolamban

RyR: Receptor de Rianodina

SERCA: Calcioatpase do Retículo Sarcoplasmático

TfR: Receptor da transferrina

VD: Ventrículo Direito

VE: Ventrículo esquerdo

Resumo

INTRODUÇÃO: A sobrecarga de ferro pode danificar vários órgãos, incluindo o sistema cardiovascular e é uma das principais causas de mortes por intoxicação em crianças. O objetivo deste estudo foi examinar se, agudamente, o ferro (Fe^{2+}) poderia agir diferentemente sobre a mecânica do miocárdio na dependência da concentração, investigando efeitos mediados por espécies reativas do oxigênio (EROs) sobre o acoplamento excitação-contração.

MÉTODOS: Para isso, foram utilizados músculos papilares de ratos wistar adultos com membrana intacta e expostos a diferentes concentrações de Fe^{2+} , ou com membrana removida por Triton X-100 e expostos a 100 μM de Fe^{2+} . A atividade da ATPase miosínica foi medida e os protocolos com músculos papilares intactos foram repetidos na presença de antioxidantes catalase (30UI), DMSO (100mM) e TEMPOL (100 μM) e EROs foram medidas por sondas fluorescentes. **RESULTADOS:** A força desenvolvida foi deprimida de maneira tempo- e concentração-dependente na exposição ao Fe^{2+} . Nenhum efeito foi notado com Fe^{2+} 25 μM , mas a partir de 100 μM , o Fe^{2+} reduziu a contração ao Ca^{2+} e este efeito foi parcialmente revertido por catalase e DMSO, mas não TEMPOL. A análise do radical OH^{\bullet} pela fluorescência do HPF indicou níveis elevados após Fe^{2+} , enquanto o $\text{O}_2^{\bullet-}$, medido pela fluorescência do DHE, foi inalterada. A atividade da ATPase miosínica foi diminuída pelo Fe^{2+} 100 e 1000 μM . A contração dependente do influxo de Ca^{2+} foi prejudicada apenas pela adição de Fe^{2+} 1000 μM e os antioxidantes não tiveram efeito. Nas fibras descascadas, o Fe^{2+} causou redução significativa na relação força-pCa, e o valor pCa50 foi reduzido em cerca de 0,55 unidades, indicando redução de sensibilidade. **CONCLUSÃO:** A sobrecarga de ferro aguda gera EROs e prejudica a contratilidade miocárdica, reduzindo a geração de força por diminuição da atividade da ATPase miosínica e da sensibilidade miofilamentar ao Ca^{2+} . Esses efeitos são, pelo menos em parte, mediados por OH^{\bullet} e H_2O_2 . No entanto, em altas concentrações (1000 μM) o Fe^{2+} parece deprimir a força também por redução do influxo de Ca^{2+} , independente do estresse oxidativo e provavelmente devido à competição com o Ca^{2+} por seus canais na membrana.

Palavras-chave: 1. Sobrecarga de Ferro 2. Contratilidade miocárdica 3. Estresse Oxidativo 4. ATPase miosínica 5. Responsividade ao Ca^{2+}

Abstract

BACKGROUND: Iron overload can damage several organs including the cardiovascular system, and is a leading cause of poisoning deaths in children. The purpose of this study was to examine whether acute ferrous iron (Fe^{2+}) can differently interfere on the myocardial mechanics, investigating the ROS-mediated effects on the excitation-contraction coupling. **METHODS:** Intact membrane and Triton-skinned rat papillary muscles were used. The activity of myosin ATPase was measured. Protocols with intact papillary muscles were repeated in the presence of antioxidants CAT, DMSO and TEMPOL, and ROS were measured. **RESULTS:** Developed force was depressed in a concentration- and time-dependent manner by Fe^{2+} , and at 100 and 1000 μM , Fe^{2+} reduced the response to extracellular Ca^{2+} increase, which was partially reversed by CAT and DMSO, but not TEMPOL. Accordingly, the $\text{OH}\cdot$ measurement by HPF dye indicated higher levels after incubation with Fe^{2+} , whereas $\text{O}_2^{\cdot-}$ as measured by the DHE dye was unchanged. The myosin ATPase activity was decreased by 100 and 1000 μM Fe^{2+} . Contractions dependent on the sarcolemal Ca^{2+} influx were impaired only by 1000 μM Fe^{2+} , and antioxidants had no effect. In skinned fibers, Fe^{2+} caused significant reduction in the pCa-force relationship, and pCa50 value was left-shifted by approximately 0.55. **CONCLUSION:** Iron overload can acutely generate ROS and impair myocardial contractility by reducing the capacity to generate force associated to reduced myosin ATPase activity and miofibrillar Ca^{2+} sensitivity. These effects are, at least in part, mediated by local production of $\text{OH}\cdot$ and H_2O_2 . Nevertheless, in a such high concentration as 1000 μM , Fe^{2+} appears to depress force also by reducing Ca^{2+} influx, which is not dependent of oxidative stress but probably due to Fe^{2+} compete with Ca^{2+} by its channels.

Key words: 1. Iron overload 2. Myocardial contractility 3. Oxidative stress 4. Myosin ATPase 5. responsiveness to Ca^{2+}

1. Introdução

1.1. Ferro

1.1.1. Aspectos Gerais

Existe um grande número de elementos químicos, entre eles os metais, essenciais para a vida e que desempenham várias funções biológicas (MARET, 2016). O metal de transição geralmente apresenta faixa de estado de oxidação mais ampla que os outros elementos e têm grande atividade catalítica (IUPAC). É o quarto metal mais abundante na crosta terrestre e o metal de transição mais abundante presente no corpo humano. Este metal tem a capacidade de mudar de valência facilmente e de se complexar com oxigênio. No estado ferroso (Fe^{2+}) é um sal solúvel, mas suscetível à oxidação e precipitação em sua forma insolúvel $\text{Fe}(\text{OH})_n$ (PONKA; TENENBEIN; EATON, 2007).

A relação entre seres vivos e o ferro vem desde os primórdios da vida. Este elemento estava presente, em sua forma ferrosa, em grandes quantidades nos mares após o surgimento da Terra. No início da vida, grande parte do O_2 produzido por bactérias fotossintetizantes participou da conversão de Fe^{2+} em Fe^{3+} , provocando grande deposição de óxido de ferro (ORGEL, 1998). Acredita-se que a reação entre ferro e enxofre formando FeS_2 foi grande fonte de energia para a redução da grande quantidade de CO_2 em compostos compatíveis com o desenvolvimento da vida. O ferro também está presente como cofator de nitrogenases de bactérias fixadoras de nitrogênio. O nitrogênio fixado pelas bactérias é disponibilizado para o ecossistema e está presente, por exemplo, nas bases nitrogenadas e aminoácidos (NUNES; RAIMONDI; NIEDWIESKI, 2003). Além disso, as reações mediadas por ferro suportam a respiração de quase todos os organismos aeróbios (PONKA; TENENBEIN; EATON, 2007). Finalmente, é essencial também para o processo de eritropoiese, síntese de DNA e respostas celulares imunológicas.

A obtenção do ferro pode ocorrer através da absorção pelo epitélio duodenal e/ou reciclagem do ferro contido nas hemoglobinas das hemácias (Dunnet *et al*, 2006). O ferro é um elemento abundante na dieta (Tabela 1). Uma das fontes de ferro alimentares são carnes vermelhas e derivados animais (ferro heme) e vegetais folhosos e grãos (ferro não heme, que está principalmente na forma férrica, Fe^{3+}) (GROTTO, 2008). Apesar de abundante

na dieta, precisa ser muito controlado em sua absorção, pois não existem mecanismos conhecidos relacionados à sua excreção e sua sobrecarga causa diversos danos à saúde (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

Tabela 1. Origem e quantidade de ferro em alguns alimentos

Ferro não heme		Ferro heme	
Fonte	ng/100g	Fonte	ng/100g
Chocolate meio amargo	17	Fígado de cordeiro	23
Salsa	10	Ostras	6,6
Soja	9	Bife de fígado	6,1
Lentilha	9	Frango	1,1
Feijão branco	7,5	Carne de porco	0,8
Feijão preto	6,7	Atum	0,9
Espinafre	2,7	Caranguejo	0,9
Pão branco	2	Camarão	0,3

Adaptado de GUDJONCIK et al., 2014

1.1.2 Cinética do Ferro no organismo

Como já mencionado, em mamíferos o ferro é obtido de duas formas: absorção pelo epitélio duodenal e/ou reciclagem do ferro contido nas hemoglobinas das hemácias (Figura 1).

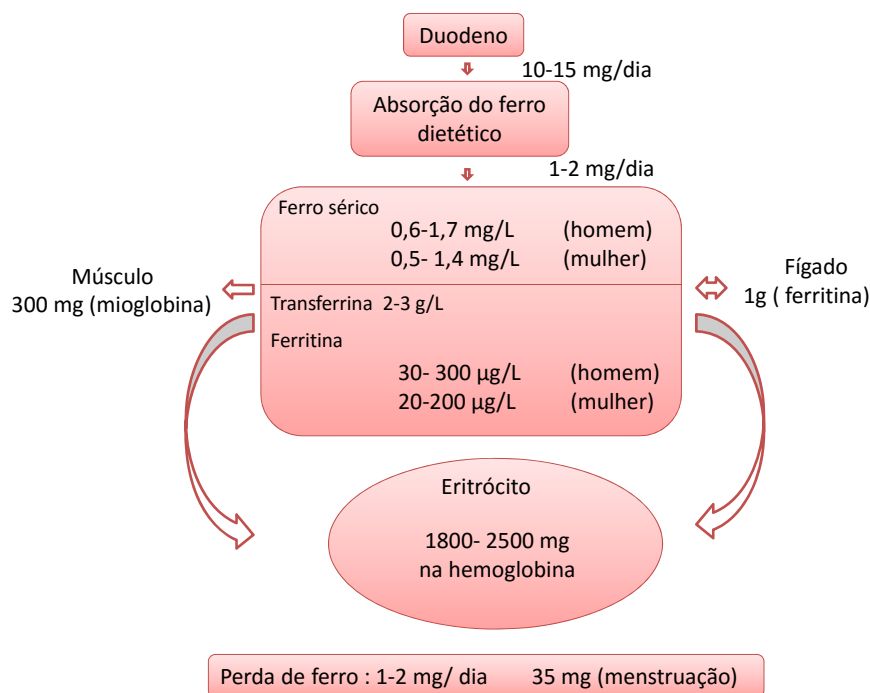


Figura 1. Principais mecanismos envolvidos na cinética do ferro no organismo. Modificado de GUDJONCIK et al., 2014

No epitélio duodenal cerca de apenas 10% do ferro encontra-se complexado com proteínas (heme) e os outros 90% encontram-se na forma iônica (não-heme). Quando na forma iônica, apresenta-se como íon férrico (Fe^{3+}). Essa forma não pode ser absorvida pelos enterócitos e necessita ser reduzida para a forma ferrosa (Fe^{2+}) pela enzima ferrirredutase, presente na membrana dos próprios enterócitos. Quando reduzido, o ferro é absorvido pelo enterócito pela ação do transportador de metal divalente (DMT-1) e associado à proteína ferritina. De acordo com a necessidade do organismo, o ferro é removido da ferritina e transportado para a circulação pela ferroportina (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

No meio extracelular o ferro ferroso é novamente oxidado pela enzima hefastina (Hp) na membrana basolateral dos enterócitos, o que permite sua ligação com a transferrina, uma proteína plasmática (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). A transferrina (Tf) atua como um quelante de ferro tornando-o indisponível na forma iônica e apenas as células que expressam o receptor de transferrina (TfR) terão acesso ao ferro de origem dietética (AISEN; ENNS; WESSLING-RESNICK, 2001; CHENG et al., 2004). Todavia, embora a captação de ferro mediada pelo TfR seja a principal via para a aquisição de ferro pela maioria das células e especialmente proeritroblastos, células do sistema imunológico e hepatócitos, vários estudos têm indicado que o mecanismo de absorção varia, dependendo do tipo de célula (GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012).

O ferro em grupos heme é absorvido nos enterócitos, porém ainda não há uma definição a respeito do(s) exato(s) mecanismo(s). É possível que o grupo heme por ser hidrofóbico se difunda pela membrana, mas esse transporte poderia ser facilitado por endocitose mediada por um receptor de grupamentos heme, ou ainda por um transportador recentemente descrito e denominado *Heme Carrier Protein1* (HCP-1) (LE BLANC; GARRICK; ARREDONDO, 2012). Depois de interiorizado, o ferro liberado do complexo como ferro ferroso pela enzima heme-oxigenase passa a ser metabolizado de maneira semelhante ao ferro dietético iônico ou ferro não-heme (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

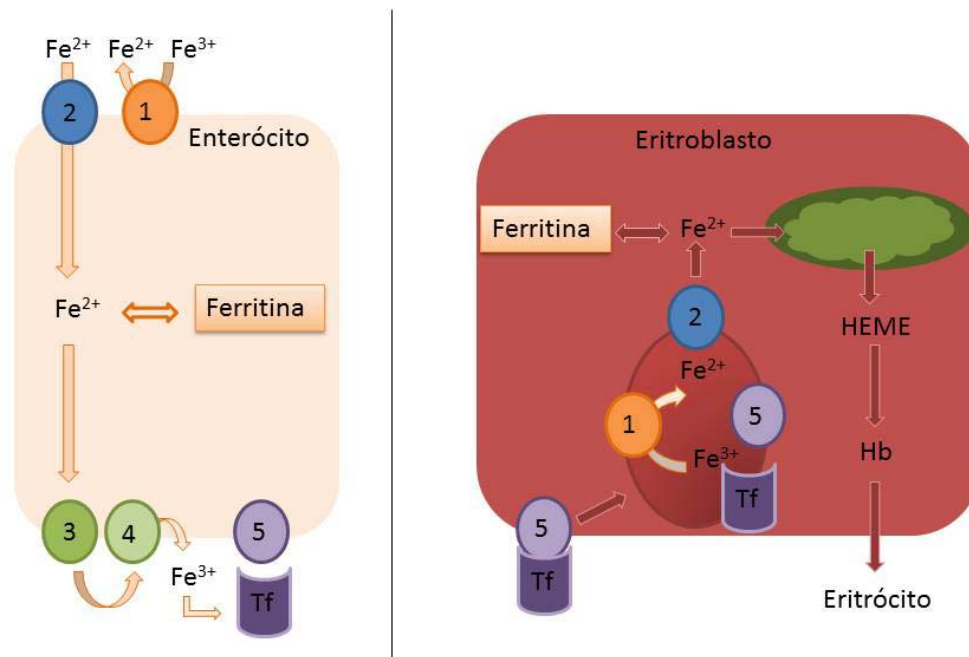


Figura 2: A – Principais vias de absorção do ferro iônico de origem dietética nos enterócitos. 1: ferriredutase; 2: DMT1; 3: ferroportina; 4 Hefastina; 5 Receptor de transferrina; Tf: Transferrina. B – Principais vias de utilização do ferro pelos eritroblastos. Hb: hemoglobina. Modificado de Muñoz, 2009.

Outra fonte de ferro para o organismo é a reciclagem a partir de hemácias senescentes pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial. A metabolização do grupo heme produz CO, ferro e bilirrubina. O Fe^{2+} pode, então, se complexar à ferritina do próprio macrófago ou ser exteriorizado pela ferroportina e transportado pela transferrina (GROTTO, 2008).

O ferro de origem dietética ou obtido a partir da degradação das hemácias é armazenado principalmente no fígado, baço e medula óssea, complexado à ferritina e disponibilizado para o sistema conforme a demanda (GROTTO, 2008). Como já referenciado, o ferro está envolvido no processo de replicação de DNA, pois é um elemento constitutivo da enzima ribonucleotídeo redutase, que converte ribonucleotídeos em dextriribonucleotídeos (ELLEDGE; ZHOU; ALLEN, 1992). Outra função do ferro é constituir os clusters Fe-S de proteínas mitocondriais e integrar os citocromos, participando da cadeia de transferência de elétrons (BARUPALA et al., 2016).

Não existem formas eficientes conhecidas para excreção de ferro. Por isso, a absorção e os estoques de ferro precisam ser rigorosamente regulados (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009). Uma maneira de controle da absorção de ferro é conhecida como bloqueio da mucosa: uma dose de ferro reduz a capacidade de absorção de uma segunda dose. Isso acontece porque o ferro absorvido provoca a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem internalização do DMT-1, diminuindo a absorção de Fe^{2+} por este transportador (ESPARZA et al., 2015).

Outro mecanismo de regulação pós-transcricional da homeostase do ferro acontece através de proteínas responsivas ao ferro (IRP1 e IRP2). Estas proteínas são sensíveis a variações dos níveis intracelulares de ferro e são capazes de se ligar aos elementos responsivos ao ferro (IRE). Os IREs são regiões em alça do RNAm de proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro, regulando a expressão das mesmas (Figura 3). Em situações de diminuição da concentração intracelular de ferro, estes elementos diminuem a tradução de proteínas relacionadas à quelação e exportação do ferro, tais como a ferritina e a ferroportina e suprimem a degradação do TfR e DMT-1, aumentando o influxo de ferro. (ROUAULT, 2006).

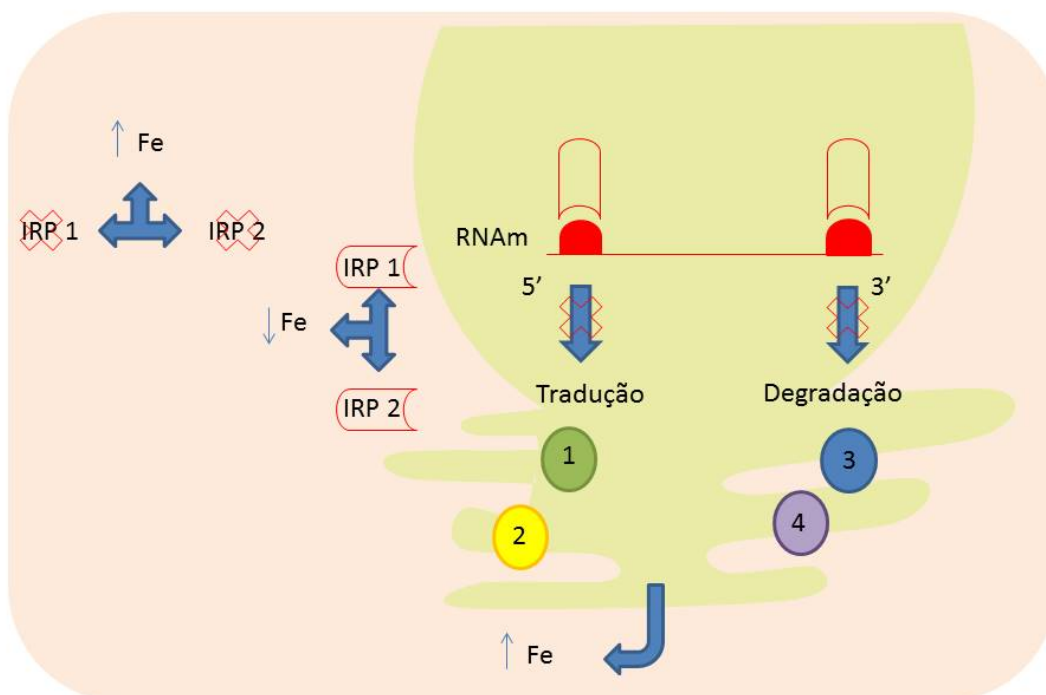


Figura 3. Controle intracelular da concentração de ferro pela ação das proteínas responsivas ao ferro. 1: Ferroportina, 2: Ferritina, 3: DMT-1, 4: TfR

Há ainda, a regulação hormonal dos níveis de ferro no organismo, que é feito pela hepcidina. A hepcidina é produzida pelos hepatócitos de forma induzida, em situações inflamação, estresse do retículo endoplasmático e nos aumentos da quantidade de ferro circulante, elevando a da saturação da Tf. Uma vez formada, ela se liga à ferroportina de outros tipos celulares como enterócitos, eritrócitos e macrófagos, e o complexo formado por estas duas proteínas é internalizado, inibindo o efluxo celular de ferro (GANZ, 2013; HUGMAN, 2006). Por outro lado, na hipóxia e anemia, a síntese de hepcidina é suprimida e, por consequência, há aumento do efluxo de ferro para fora das células, assim como aumento da sua absorção no epitélio intestinal.

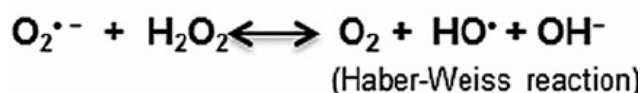
1.1.3. Ferro e estresse oxidativo

Nossa atmosfera, rica em O_2 , permitiu o desenvolvimento e a evolução de muitas espécies com grande capacidade metabólica baseada na respiração aeróbia, e as reações de redução e oxidação são responsáveis por fornecer grande parte da energia para os seres vivos (ALBERTS, 2007). Contudo, as reações que envolvem O_2 são capazes de formar EROs.

As EROs são moléculas resultantes da oxi-redução do O_2 , ou seja, da perda ou ganho de elétrons. A formação das EROs acontece fisiologicamente em todos os tecidos, como consequência do metabolismo aeróbio que geralmente forma os intermediários reativos: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As EROs possuem número ímpar de elétrons desemparelhados na camada de valência, com exceção do H_2O_2 e participam dos processos de produção de energia, de destruição de microrganismos patogênicos na fagocitose, de regulação do crescimento celular e da sinalização intercelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O estresse oxidativo se estabelece quando a ação dos radicais livres supera a ação antioxidante do organismo que compreendem enzimas (GPx, SOD, CAT), vitaminas (por exemplo A e E), flavonóides e a ferritina e transferrina, proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, entre outros fatores (HALLIWELL et al., 1995).

Os organismos multicelulares necessitam de um sistema de alta eficiência para transporte de O_2 e utilizam o ferro presente na hemoglobina, na mioglobina e nos citocromos para o transporte e metabolismo do O_2 . Por sua capacidade de alterar facilmente sua valência, o ferro é eficiente não só no transporte de O_2 , mas também em transferir ou receber elétrons, formando algumas EROs (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001).

O ferro catalisa a reação de Fenton, que é a reação entre o H_2O_2 e sais ferrosos estimulando a formação de radicais livres, responsáveis por várias injúrias celulares tais como danos na membrana celular, DNA e proteínas (ARTMAN et al., 1984a; WINTERBOURN, 1995a).



A conversão do superóxido em H_2O_2 e OH^{\cdot} catalisada pelo Fe^{2+} causa peroxidação de lipídeos da membrana de diversas organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias e microssomos, com consequente dano celular, fibrose reativa e esclerose (SANTOS et al, 2009). O radical hidroxila é a mais reativa das EROs, apresenta meia-vida muito curta (10^{-9} segundos) e ação oxidante extremamente potente. Além disso, na presença de ferro, a vitamina C através da reação de Fenton é convertida no íon ascorbato, também potencialmente tóxico ao organismo (SOUZA; LOCATELLI, 2012).

1.1.4. Sobrecarga de Ferro

O equilíbrio das concentrações de ferro no organismo e o funcionamento harmonioso dos processos de metabolismo do metal são muito importantes,

pois alterações nos níveis de ferro têm consequências graves sobre a saúde: a falta de ferro provoca a anemia, com prejuízo do transporte de oxigênio pelos eritrócitos, enquanto a sobrecarga deste elemento está associada à formação de radicais livres e peroxidação lípica, comprometendo a função de diversos órgãos e sistemas (MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

A sobrecarga crônica de ferro pode resultar de transfusões sanguíneas recorrentes, casos de doenças hepáticas, hematológicas ou desordens genéticas que prejudicam seu metabolismo como as talassemias e hemacromatoses hereditárias (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004). Quando consequência de doenças genéticas envolvendo os elementos responsivos ao ferro (hemocromatose hereditária), temos a sobrecarga primária e; quando provocada por doenças adquiridas, denomina-se sobrecarga secundária (Santos et al, 2009).

Sem um tratamento auxiliar para quelação do ferro em excesso, pacientes dependentes de repetidas transfusões sanguíneas desenvolvem acúmulo do metal que causa danos em vários tecidos e pode até provocar morte (BORGNA-PIGNATTI et al., 2004). Estes pacientes são principalmente portadores de um grupo de distúrbios genéticos na síntese de hemoglobina – talassemias- e que desenvolvem anemia crônica e, por isso, são dependentes de transfusões sanguíneas regulares (TOMÉ-ALVES et al., 2000). Embora o ferro hepático seja o principal parâmetro da avaliação do acúmulo de ferro em pacientes talassêmicos, é no músculo cardíaco que o ferro exerce seu papel mais importante, sendo a doença cardíaca a principal causa de morte nestes pacientes (PAULA; SAAD; COSTA, 2003).

A hemocromatose é uma doença autossômica recessiva, caracterizada pela sobrecarga de ferro causada por mutações nos genes que regulam o metabolismo do ferro, o que ocasiona o aumento da absorção do metal no epitélio duodenal. O ferro se deposita nos tecidos ocasionando lesões e danos funcionais (BARDOU-JACQUET; BRISSOT, 2014). Clinicamente, a hemocromatose apresenta sintomas como fadiga, artrite, dores abdominais e perda de peso, entre outros (Santos et al, 2009).

A sobrecarga de ferro também pode acontecer de forma aguda e é um grande problema toxicológico (BANNER; TONG, 1986). O acesso a medicamentos que contem ferro é fácil, porque não exige prescrição médica. A

intoxicação por ferro é a única que não envolve um xenobiótico e está muito associada com a sobrecarga e morte em crianças pequenas (PONKA; TENENBEIN; EATON, 2007). As drágeas de sulfato ferroso são bastante semelhantes a balas e doces e, isso comumente provoca ingestão acidental de grande quantidade de ferro (CROTTY, 1971; FINE, 2000).

Sais de ferro como sulfato ferroso, fumarato de ferro e gluconato de ferro são comumente utilizados em complementos orais de ferro. O sulfato ferroso é rapidamente absorvido e altos níveis de saturação de transferrina e de ferro livre (até $6\mu\text{M}$) podem ser atingidos após a administração de uma dose de 100 mg de ferro (SCHÜMANN et al., 2012), o que corresponde a menos de uma drágea.

No entanto, a intoxicação por ferro também pode ocorrer em adolescentes e adultos através de sobredosagem intencional de medicamentos com intenção suicida, ou na suplementação deste elemento durante a gravidez ou como tratamento de anemias do tipo não-ferropriva, resultando em significativa morbidade e mortalidade (WATSON et al., 2004).

Os principais órgãos e tecidos prejudicados pelo excesso de ferro são os que têm alta concentração deste metal e elevada atividade metabólica: trato gastrointestinal, fígado e coração (FINE, 2000). A sobrecarga de ferro aguda resultante de overdose acidental ou intencional é potencialmente fatal (PONKA; TENENBEIN; EATON, 2007). O depósito contínuo de ferro no fígado desencadeia um processo inflamatório que provoca um enrijecimento que pode evoluir para cirrose ou câncer. No pâncreas, o processo inflamatório, causado por ferro em excesso, pode prejudicar a capacidade de se produzir insulina, levando a um quadro de diabetes. No coração, o efeito tóxico do ferro pode provocar arritmias e insuficiência cardíaca, mesmo em pessoas jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

O excesso de ferro no coração está relacionado à perda da função cardíaca (BUJA; ROBERTS, 1971). No sistema cardiovascular, a sobrecarga de ferro está associada à diminuição do débito cardíaco, o aumento da reatividade vascular e diminuição da contratilidade cardíaca (BARTFAY et al., 2000; FINE, 2000; MARQUES et al., 2015)

1.1.5 Modelos experimentais de sobrecarga de Ferro

Alguns modelos animais são utilizados para estudo da sobrecarga de ferro. Nos anos 1980, estudos demonstraram que a exposição aguda a altas concentrações de ferro *in vivo* ou *in vitro* é capaz de comprometer a função cardíaca (ARTMAN; OLSON; BOERTH, 1982; ARTMAN et al., 1984a, 1984b). MAHONEY et al., (1989) realizaram um estudo com modelo de intoxicação por ferro via oral e via injeção intraperitoneal em camundongos em doses crescentes e observou que o índice de mortalidade após 24 horas da administração do ferro aumentava conforme as doses administradas aumentavam. SOUZA e LOCATELLI (2012) avaliaram o efeito do tratamento de sulfato ferroso, muito comum em pacientes anêmicos, associado à vitamina C em ratos Wistar por trinta dias, o que provocou sobrecarga de ferro. Foram observados aumento de níveis de radicais livres, desenvolvimento de doenças cardiovasculares e hepáticas. Outro estudo envolvendo suplementação de ferro por trinta dias e estresse oxidativo também demonstrou acúmulo de ferro e aumento de radicais livres pelo método de malondialdeído (DOURADO, 2012). MOON et al. (2011) realizaram injeções intraperitônicas de ferro dextrano em ratos e avaliaram a função cardíaca relacionada a diferentes níveis de concentrações de ferro sanguíneo e observaram que a sobrecarga de ferro é capaz de provocar hipertrofia cardíaca. Recentemente, um grupo chinês demonstrou que a sobrecarga de ferro em ratas gestantes provoca danos no fígado de filhotes, associados ao estresse oxidativo (JIANG et al., 2015).

Nosso grupo demonstrou que a administração intraperitoneal aguda de ferro dextrano *in vivo* em fêmeas é provoca alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, também com aumento da produção de EROs (ROSSI et al., 2015). Outro estudo do nosso grupo analisou o efeito da administração intraperitoneal de ferro (100mg/kg^{-1}) cronicamente sobre a reatividade vascular e também demonstrou a participação do estresse oxidativo na hiper-reatividade à fenilefrina (MARQUES et al., 2015). Finalmente, afora os anteriormente mencionados, existem poucos estudos *in vitro* sobre a ação aguda e crônica do ferro na função contrátil do miócito cardíaco.

1.1.6 Ferro e a mecânica miocárdica

O acoplamento excitação-contração cardíaca é o processo pelo qual ocorre a contração dos miócitos em resposta à estimulação elétrica (BERS, 2002). O impulso elétrico no coração, gerado nos átrios, é conduzido através dos cardiomiócitos, disparando o potencial de ação, através de junções comunicantes em função da baixa resistência elétrica das mesmas e da diferença de potencial entre as células. Deste modo, o músculo atua como um sincício elétrico e funcional. Em repouso, o potencial de membrana da célula cardíaca ventricular está próximo de -80 mV. Durante a fase de despolarização consequente do influxo de Na^+ , o potencial atinge aproximadamente 0 mV e ocorre a abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem do tipo L o mais comum no coração, principalmente na região do túbulo T (BERS, 2002).

Contudo, o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} provocado pelo influxo transsarcolemal é essencial, mas não é o suficiente para promover a contração efetiva do músculo estriado cardíaco. O Ca^{2+} de origem extracelular pouco participa diretamente da contração através de sua ligação com as proteínas contráteis, mas sim, principalmente por se ligarem Receptor de Rianodina (RyR), um canal de liberação de Ca^{2+} do Retículo Sarcoplasmático (RS), promovendo liberação de cálcio-cálcio induzida. Com isso, a concentração de Ca^{2+} no citosol varia de aproximadamente 10^{-7} M no repouso até 10^{-5} M durante o potencial de ação (BERS; SHANNON, 2013). Para o músculo cardíaco, não é possível regular a geração de força pelo recrutamento de mais fibras durante a contração (somação espacial) e ainda fundir contrações sucessivas somando forças (somação temporal) como ocorre no músculo estriado esquelético. Dessa forma, a regulação da capacidade de geração de força no músculo cardíaco é feita principalmente por alterações no influxo de Ca^{2+} do meio extracelular, liberação pelo RS, ou na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} disponível. Acredita-se que todos esses eventos podem ser influenciados pelo comprimento da fibra em repouso (Lei de Frank Starling) e pela estimulação adrenérgica (LEE; ALLEN, 1993).

De acordo com a Lei de Frank Starling (STARLING; VISSCHER, 1927) o estiramento da fibra muscular está relacionado, até certo ponto, com o

aumento da capacidade de geração de força. Esta capacidade está relacionada à abertura de canais de Ca^{2+} da membrana sensíveis a estiramento, aumento da área de interação entre actina e miosina, exposição do quarto sítio de ligação de Ca^{2+} da TnC e aumento da concentração de Ca^{2+} no sarcômero (CALAGHAN; BELUS; WHITE, ; FUCHS; SMITH, 2001). A estimulação simpática age pela ligação da noradrenalina a receptores β -adrenérgicos que estão acoplados à proteína G, formando AMPc pela ação da enzima adenilato ciclase quando estimulada. O AMPc é ativador da proteína cinase A (PKA), que fosforila canais de Ca^{2+} e aumenta o influxo através da membrana. Além disso, a PKA fosforila RyR aumentando a probabilidade de abertura e liberação de Ca^{2+} do RS, e ainda fosforila a fosfolamban (PLB) liberando sua inibição sobre a ação da Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA) em recaptar o Ca^{2+} para o RS.

O Ca^{2+} disponível no citoplasma se liga às proteínas contráteis para disparar a contração. O músculo cardíaco é do tipo estriado, ou seja, possui as proteínas contráteis organizadas em sarcômeros, que são unidades compostas por filamentos finos (actina) e grossos (miosina) que se arranjam linearmente no miócito formando a miofibrila. Os filamentos finos são compostos por actina, tropomiosina e troponina, sendo as últimas responsáveis por regular a contração. A tropomiosina bloqueia os sítios de interação onde a miosina se liga. Já a troponina é um complexo proteico formado por três subunidades: a Troponina I (TnI), Troponina T (TnT) e Troponina C (TnC) que modulam a interação actina-miosina. É a TnC a subunidade que contém os sítios de ligação ao Ca^{2+} e, na ausência deste, inibe a ativação da ATPase miosínica pela actina. O filamento grosso, ou miosina, é composto por duas cadeias pesadas, 4 leves e duas regiões em forma de dobradiça. A cabeça da miosina contém regiões de alta atividade ATPásica dependente de Ca^{2+} e alta afinidade pela actina, importante na formação das pontes cruzadas. A contração do músculo cardíaco acontece quando a cabeça da miosina estabelece pontes cruzadas com a actina e deslizam sobre ela, promovendo o encurtamento do sarcômero, num processo dependente de ATP (BERS, 2002).

Para que ocorra o relaxamento, a concentração citosólica do Ca^{2+} deve diminuir, o que faz com que esse íon se desassocie da troponina C. Em ratos, a principal forma de extrusão de Ca^{2+} é pela ação da SERCA (importador de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático). Além disso, o Ca^{2+} pode ser retirado do

citossol através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (NCX) e de ATPase do sarcolema e de um transportador da mitocôndria (BERS; SHANNON, 2013).

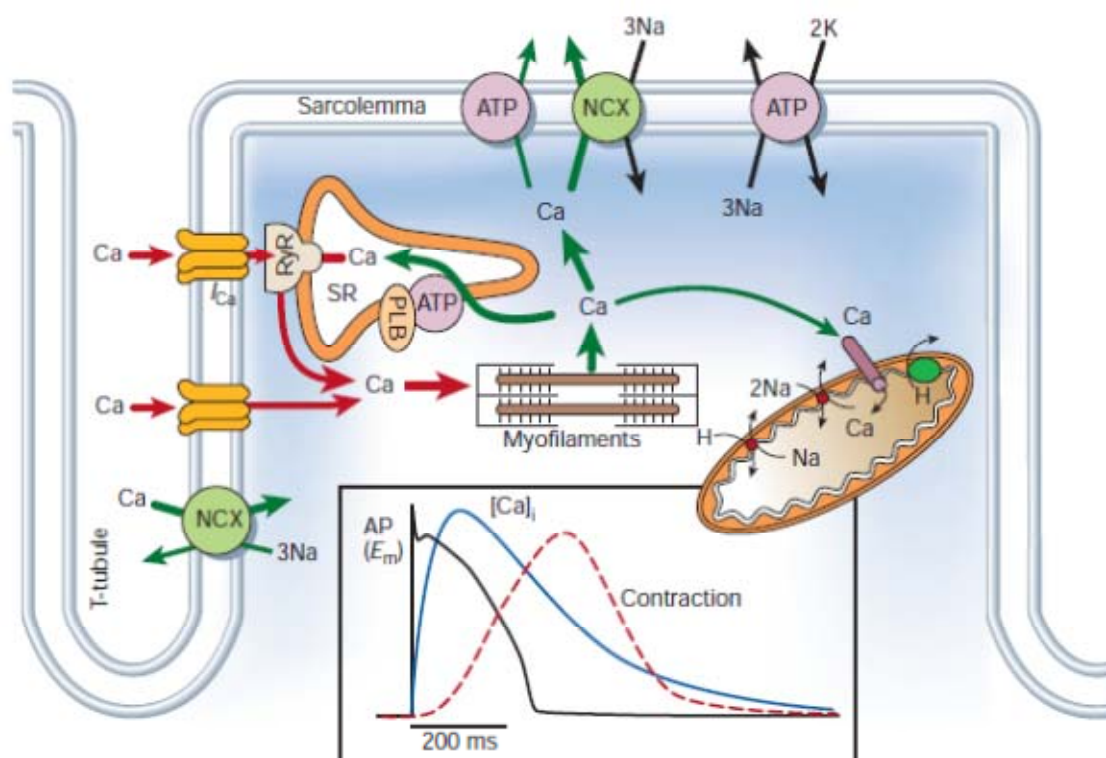


Figura 4. Representação do processo de acoplamento excitação-contracção do músculo cardíaco. SR: retículo sarcoplasmático, ATP: ATPase, PLB: fosfolamban, NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, RyR: receptor de Rianodina, AP: potencial de ação, I_{Ca} : corrente de Ca^{2+} . Bers, 2002.

Na literatura encontramos poucos dados sobre a influência do ferro no processo de acoplamento excitação-contracção. Em miocárdio isolado de coelhos, 90 min de exposição à dose de 1,8 mM de sulfato ferroso (Fe_2SO_4) reduz o pico de tensão e a força máxima de contracção (ARTMAN et al., 1984a). Em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatais, o ferro (III) (citrato de ferro amoníaco) reduz a contratilidade, efeito revertido por cafeína e Ca^{2+} , mas não por epinefrina (MOREB; HERSHKO; HASIN, 1988).

Além disso, foi descrito que o ferro modula ação do canal de RyR e provoca um efeito inotrópico negativo: o Fe^{3+} (cloreto de ferro III) deprime a acumulação de Ca^{2+} ; e o Fe^{2+} (sulfato de ferro II) inibe a liberação de Ca^{2+} no RS (KIM; GIRI; PESSAH, 1995a). Como o ferro catalisa reações de Fenton produzindo radicais livres, este fato também deve estar associado à redução da contratilidade miocárdica (WJ et al., 1999).

De acordo com OUDIT et al (2006), níveis elevados de ferro presentes na sobrecarga crônica deste metal estão associados à disfunção diastólica, arritmia e cardiomiopatias e o transporte de Fe^{2+} por canais de Ca^{2+} aumenta a suscetibilidade a acúmulo de ferro intracelular. A disfunção cardíaca causada pelo ferro livre é multifatorial e está associada com a formação de radicais livres, acidose e desequilíbrio da homeostase do Ca^{2+} (BARTFAY et al., 2000; OLSON; BOERTH, 1982). Tal como ilustrado na figura 5, a sobrecarga crônica de ferro provoca uma cardiomiopatia restritiva (volume diastólico reduzido), caracterizada por disfunção diastólica precoce, que progride para uma cardiomiopatia dilatada em fase terminal: dilatação e prejuízo da função contrátil do ventrículo esquerdo (OUDIT et al., 2003)

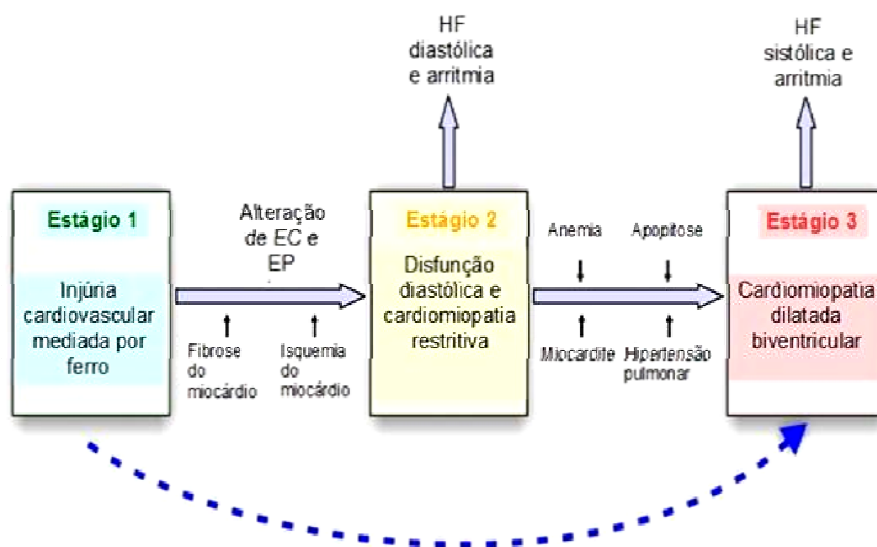


Figura 5. Espectro do desenvolvimento de doenças do coração em pacientes com sobrecarga crônica de ferro. EC, acoplamento excitação-contração, EP, eletrofisiologia; HF, Insuficiência Cardíaca; PH, Hipertensão Pulmonar. A linha a tracejada indica que alguns doentes podem progredir rapidamente para a fase de cardiomiopatia dilatada. Adaptado de Murphy & Oudit, 2010.

Dessa maneira, embora os efeitos clínicos da sobrecarga de ferro no coração já sejam conhecidos, os mecanismos pelos quais este metal provoca as alterações cardíacas ainda não foram adequadamente identificados.

Como já discutido, os sintomas e efeitos clínicos da intoxicação por ferro são bastante variados e relacionados a fatores como idade, dose administrada, concentrações plasmáticas, pré-disposição primária ou secundária a acúmulo de ferro e tempo de exposição. Como o ferro é um elemento naturalmente presente no organismo, é um catalisador de EROs e seus efeitos podem ser

diretos e/ou mediados pelo estabelecimento do estresse oxidativo, podendo alterar diferentes mecanismos do processo de contração cardíaca, os alvos de suas ações em situações de sobrecarga podem ser extremamente variados. Além disso, os efeitos sistêmicos do ferro estão associados a diferentes níveis de ferro livre e, por isso, torna-se relevante e fundamental entender as consequências da exposição a diferentes concentrações de ferro. Baseada nisto, a hipótese deste trabalho é que o ferro (II) é capaz de comprometer a contratilidade de músculo papilar de ratos, agindo sobre diferentes pontos do acoplamento excitação-contração, de acordo com a concentração a que estes músculos são expostos.

2. Objetivo:

O objetivo do estudo foi estudar a influência de diferentes concentrações de ferro II (Fe^{2+}) sobre a mecânica da contração miocárdica de ratos, avaliando seus efeitos sobre os mecanismos envolvidos no acoplamento excitação- contração do músculo cardíaco.

2.1. Objetivos específicos:

1. Analisar os efeitos agudos de diferentes concentrações de ferro e o curso temporal desses efeitos sobre a contratilidade de músculos papilares de rato

2. Avaliar seus impactos sobre o papel do influxo transsarcolemal de Ca^{2+} , do retículo sarcoplasmático, sobre a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e sobre as respostas inotrópicas do miocárdio isolado

3. Avaliar o papel do estresse oxidativo provocado pela exposição aguda ao ferro no músculo papilar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos wistar machos (*Rattus rattus*), com peso entre 200 e 250g, foram obtidos do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os procedimentos estiveram de acordo com a Diretriz Brasileira para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos publicada pelo CONCEA (2013), e foram aprovados pela Comissão de Ética em Utilização de Animais (044/2014) em conformidade com suas resoluções.

3.2. Protocolos experimentais

3.2.1. Análise “in vitro” da mecânica miocárdica

Os animais foram anestesiados com a aplicação intraperitoneal de uretana (1,2 mg/kg). Após a anestesia, o coração foi retirado rapidamente do tórax e colocado em solução de Krebs-Henseleit, previamente oxigenada com mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico, e aquecida a 30°C. A parede livre do ventrículo direito foi separada para expor o septo interventricular, que foi dividido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo fossem adequadamente expostos. O músculo papilar posterior (amostra do ventrículo esquerdo) foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de silicone e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida imerso em uma cuba contendo 20 ml de solução de Krebs-Henseleit. A extremidade superior foi conectada por anel e fio de aço inoxidável a um transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) e o anel da extremidade inferior do músculo conectado a um gancho fixo na cuba de vidro como mostra a figura 6. A solução de Krebs-Henseleit (KH) é composta, em mM: 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,25 CaCl; 1,15 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,5 glicose, tem pH e oxigenação mantidos pelo borbulhamento de mistura gasosa contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico e temperatura controlada em 29 °C por meio de um banho-maria circulante (LEITE; VASSALLO; MILL, 1988). O transdutor era conectado a um microcomputador dotado do software AcqKnowledge® 3.7.5. (Biopac Systems Inc., CA, USA)

que permitia determinar os valores das variáveis fisiológicas analisadas. Paralelamente ao músculo, posicionam-se dois eletrodos de platina acoplados a estimulador elétrico que liberam estímulos em onda quadrada de 5 milissegundos de duração. Todos os músculos foram estimulados em frequência de 0,5 Hz, de modo semelhante a estudos de contratilidade da literatura, com o objetivo de poupar gasto energético do músculo.

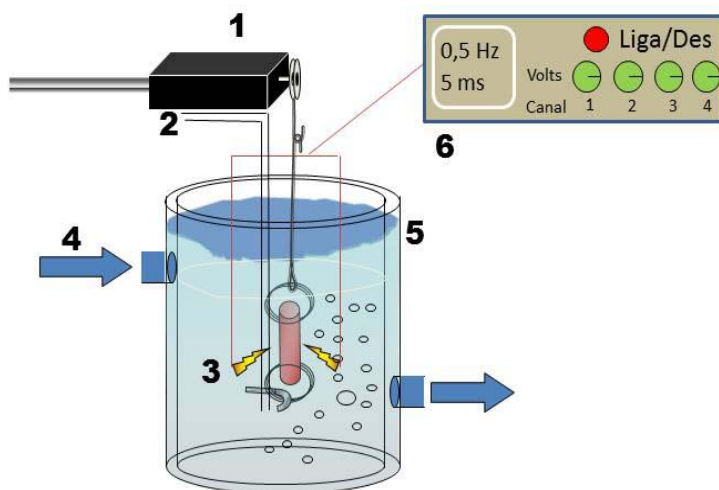


Figura 6. Esquema representativo do sistema de avaliação da contratilidade de músculo papilar intacto. 1: transdutor de força, 2: sistema de aerção com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: eletroestimulador. Adaptado de Rivaroli (2011).

Foram feitos sucessivos estiramentos, até atingir o ápice da curva estiramento-tensão e, então, determinado seu $L_{\text{máx}}$ (comprimento diastólico da fibra muscular associado à máxima força isométrica desenvolvida). O músculo permaneceu em contração isométrica estável em $L_{\text{máx}}$, por 60 minutos antes do início dos experimentos. A administração aguda de ferro foi feita na forma de sulfato ferroso II (FeSO_4). Sendo assim, os grupos experimentais consistiram em não exposto à solução contendo ferro (KH) e exposto à solução acrescida de Fe^{2+} ($\text{KH} + \text{Fe}^{2+}$).

Para avaliar o efeito do Fe^{2+} em diferentes concentrações sobre a força desenvolvida, uma curva concentração-resposta foi realizada (10 a 1000 μM), com intervalos de 30 minutos entre cada concentração, sendo observada estabilização dos parâmetros para aquisição dos valores analisados.

Num outro conjunto de experimentos, a mecânica dos músculos papilares foi avaliada, ao longo do tempo, pela utilização de solução KH padrão

(sem Fe^{2+}), ou KH contendo 25 a 1000 μM Fe^{2+} ao longo de 60 minutos de observação para cada.

Com base nos resultados encontrados nestas duas primeiras análises, foram realizados diferentes protocolos de avaliação da contratilidade miocárdica sob administração aguda de Fe^{2+} a 25, 100 e 1000 μM , sendo analisados os seguintes parâmetros descritos a seguir e esquematizados na figura 7.

Força: força isométrica desenvolvida. A força desenvolvida (g) foi normalizada pela massa do respectivo músculo, sendo expressa como g/mg. De acordo com BOCALINI e TUCCI, (2009), a normalização da força desenvolvida pelo músculo papilar é a mais apropriada, visto que o desenvolvimento de força está relacionado não só com a contração das fibras musculares orientadas na vertical mas com toda a massa do papilar.

dF/dt : Taxa de variação da força desenvolvida por unidade de tempo. Foi dada pelo cálculo da primeira derivada temporal dos valores de força, sendo avaliadas as máximas derivadas positiva ($+dF/dt_{\text{máx}}$) e negativa ($-dF/dt_{\text{máx}}$) como parâmetros de performance da contração (sístole) e do relaxamento (diástole), respectivamente.

TP: Tempo (em milissegundos) para atingir o pico da força desenvolvida, como parâmetro temporal de capacidade contrátil.

TR₅₀: Tempo (em milissegundos) decorrido para a força decrescer 50% de seu valor máximo desenvolvido, como parâmetro temporal de capacidade de relaxamento.

Resposta contrátil após pausa de estímulos elétricos (potenciação pós-pausa)

Os músculos, em solução contendo 1,25 mM de Ca^{2+} , foram submetidos a períodos crescentes de pausa do estímulo elétrico (5, 10, 15, 30, 45 e 60 segundos), para avaliar a amplitude da contração após a pausa, considerada como indicador da função do RS (BOCALINI et al., 2012; MILL; VASSALLO; LEITE, 1992). A contração após a pausa de estímulos foi normalizada pelo valor relativo às contrações que precedem a pausa, aguardando-se o retorno da contração para as condições basais entre um teste de pausa de estímulos e outro (aproximadamente 1 minuto).

Resposta contrátil ao cálcio

A solução nutriente foi trocada por uma solução contendo a metade da concentração de Ca^{2+} (0,5 mM). Foram adicionadas doses de uma solução com elevada concentração de cloreto de cálcio (500 mM), para avaliação da resposta inotrópica do músculo ao Ca^{2+} . A curva concentração-resposta ao Ca^{2+} foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada, após o acréscimo na concentração extracelular de Ca^{2+} (0,5; 1; 1,5 e 2 mM) na solução de superfusão dos músculos papilares. A força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

Resposta contrátil ao agonista do receptor β -adrenérgico

Após novo período de estabilização, foi feita adição de isoproterenol à solução contendo 0,62 mM de cloreto de cálcio. A incubação com isoproterenol (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi feita para obter concentrações crescentes de 10^{-11} μM a 10^{-4} μM , e aguardada devida estabilização dos parâmetros frente ao estímulo farmacológico. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg. Adicionalmente, a resposta ao isoproterenol também foi expressa como aumento percentual em relação à força basal.

Papel do influxo de cálcio transsarcolemal para a contração miocárdica

O seguinte protocolo foi realizado segundo previamente descrito (LEITE; VASSALLO; MILL, 1988) para avaliar a interferência da exposição ao ferro no papel do influxo de Ca^{2+} transsarcolemal para contração miocárdica. Para isso, foi utilizada a solução KH previamente descrita, porém livre de Ca^{2+} e acrescida de 10 mM de cafeína. Este procedimento permite anular o conteúdo de Ca^{2+} intracelular e do RS (DE BELCHIOR et al., 2015), visto que nessa concentração a cafeína depleta os estoques de Ca^{2+} por se ligar aos receptores de rianodina do RS (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994) enquanto a ausência de Ca^{2+} extracelular facilita sua extrusão pela membrana. Em seguida, os músculos

eram lavados, por duas vezes, com a mesma solução e mantida por 10 minutos sem estímulos elétricos. Imediatamente antes de a estimulação ser reiniciada, a solução era trocada por uma KH contendo Ca^{2+} 1,25mM. Com o reinício da estimulação elétrica, pode-se inferir que a 1ª contração após o repouso é praticamente dependente do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular. Esta contração após o repouso de estímulos foi expressa como a porcentagem em relação à amplitude da contração em $L_{\text{máx}}$ (antes do repouso de estímulos).

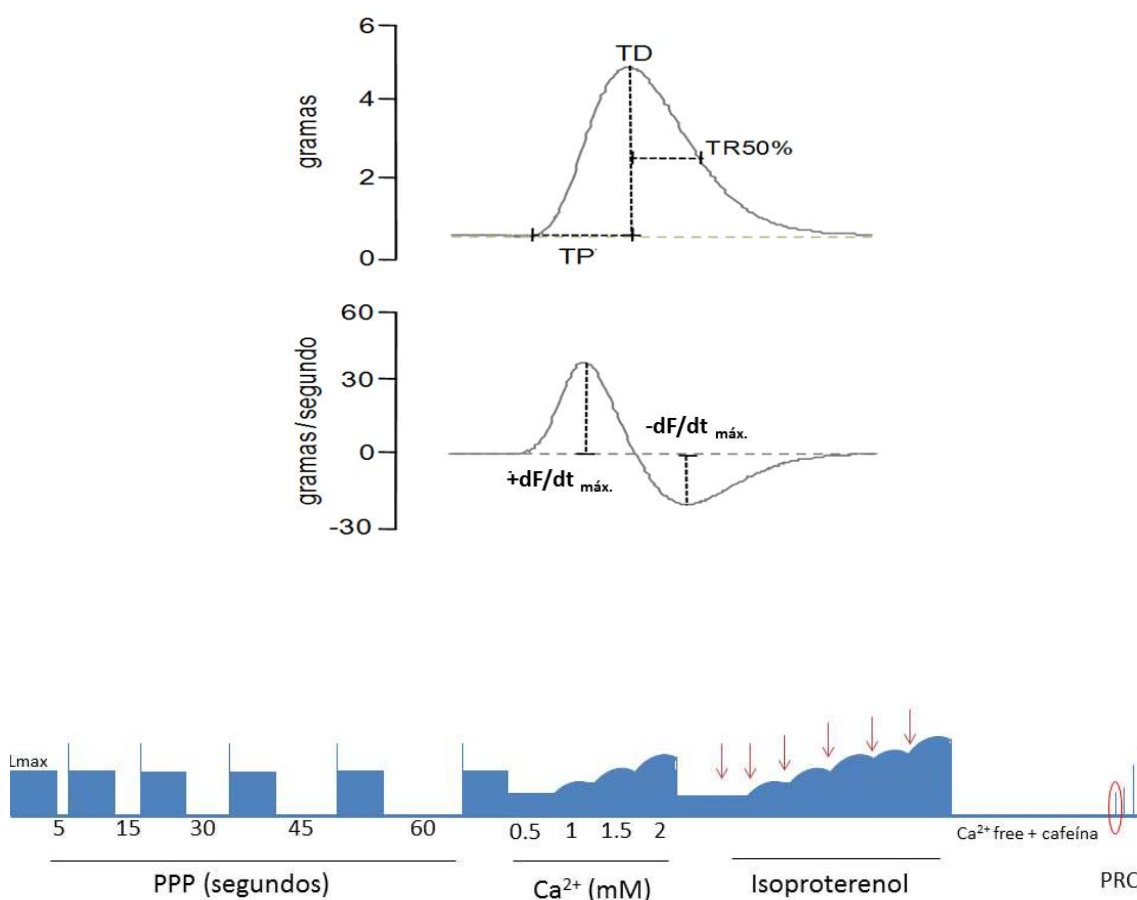


Figura 7. Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade do músculo papilar intacto. TP: Tempo para o Pico de força, TR_{50} : Tempo para 50% do relaxamento, PPP: Potenciação Pós Pausa, PRC: Post Resting Contraction.

Terminadas as manobras de avaliação da mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados do sistema e o segmento miocárdico contido entre os anéis de aço foi pesado em balança de precisão.

Avaliação da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}

Para avaliar a responsividade miofilamentar ao Ca^{2+} , os papilares foram montados horizontalmente em uma cuba com 3mL de solução de Ringer contendo em mM: 110NaCl, 4 KCl, 2 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 Tris e 5,5 glicose, pH 7,4. A solução foi mantida em temperatura ambiente e foi constantemente oxigenada e agitada. A porção do papilar unida ao miocárdio foi fixada a uma haste móvel e a porção tendinosa foi presa em um clipe acoplado a um transdutor de força (Fort 10 WPI, Transduction LaboratoriesCo.). Os papilares foram estimulados a 0,5Hz e 10–15V, com duração de 5 milissegundos para estabelecimento do L_{max} e a estimulação foi realizada por um par de eletrodos de platina posicionados ao longo do músculo (figura 8). Deste modo, embora não tenha havido padronização do comprimento do sarcômero, nos certificamos que a sensibilidade ao Ca^{2+} foi avaliada no comprimento ótimo de sarcômero.



Figura 8. Músculo papilar montado horizontalmente em cuba de uma placa móvel, contendo solução de Ringer oxigenada, pH 7,4 eletricamente estimulado e conectado a um transdutor de força.

Em seguida, os papilares, mantidos sob igual estiramento, ou seja, em L_{\max} , foram transferidos para uma cuba contendo solução contendo (em mM) 1 Mg^{2+} , 1 MgATP, 5 EGTA, 15 NaCP, 50 BES (*N,N*-BIS (2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) livre de Ca^{2+} e 1% de Triton X-100, para solubilização das membranas e alta concentração de EGTA (Ethyleneglycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraaceticacid), para quelação do Ca^{2+} (LOFRANO-ALVES et al., 2005). O Triton é um surfactante que atua quebrando interações entre lipídios e entre lipídios e proteínas, mas preservando as interações entre proteínas, de modo que elas permanecem viáveis em sua forma ativa (ARNOLD; LINKE, 2007). A composição das soluções foi formulada por programa de computador, considerando sempre força iônica 200 mM, de acordo com GODT e LINDLEY (1982). O músculo permaneceu nesta solução por 20 minutos e, decorrido este tempo, foi exposto a uma solução de pCa 7,4 ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$) até a estabilização da linha de base do registro. Quando a estabilização era alcançada, o músculo era transferido para soluções de pCa 7,0; 6,4; 6,0; 5,8; 5,6; 5,4; 5,2; 5,0 e 4,0, até atingir o platô de contração. Logo em seguida, o músculo era transferido para uma solução relaxante de pCa 8,5 e alta concentração de EGTA contendo 100 μM de Fe^{2+} por 30 minutos.

Após este período o músculo era novamente exposto as soluções com pCa crescentes de Ca^{2+} , sempre na presença de 100 μM de Fe^{2+} . O pH das soluções foi medido no início e no final do protocolo.

Ao final do protocolo, os músculos foram medidos em extensão e largura e a força (em g) foi corrigida pela área de secção transversa do músculo papilar. Os registros foram coletados usando o sistema de aquisição PowerLab 4/30 (AD Instrument) e analisados usando o programa Lab Chart 7.3.7.

Para análise da sensibilidade do músculo papilar antes e após a exposição ao Fe^{2+} 100 μM , a força desenvolvida em cada pCa foi normalizada pela força máxima desenvolvida (F_{\max}) na ausência e presença de Fe^{2+} . A força foi plotada numa relação não sigmoidal com slope fixo, para o cálculo da pCa_{50} , que é a pCa onde o músculo desenvolveu 50% da força máxima, e é um indicador de sensibilidade ao Ca^{2+} .

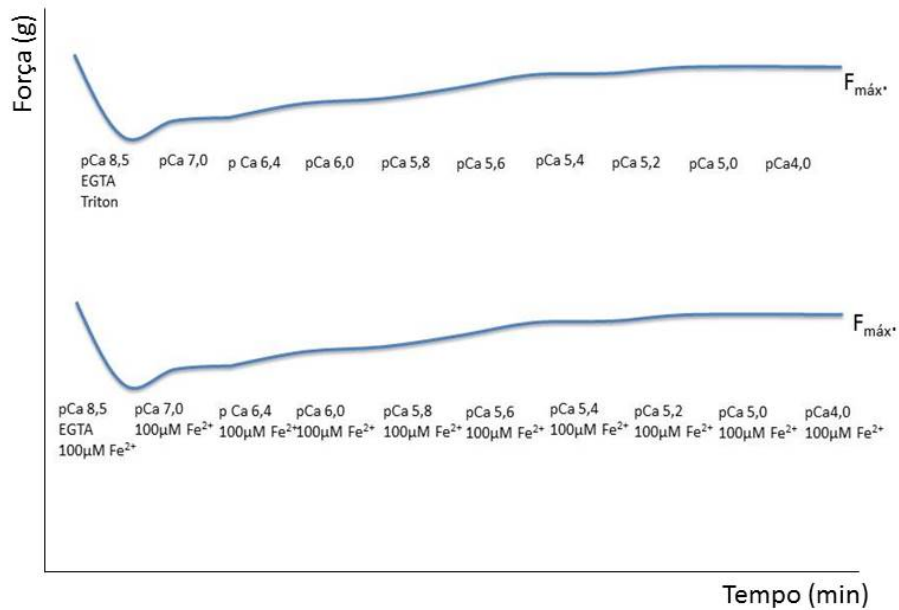
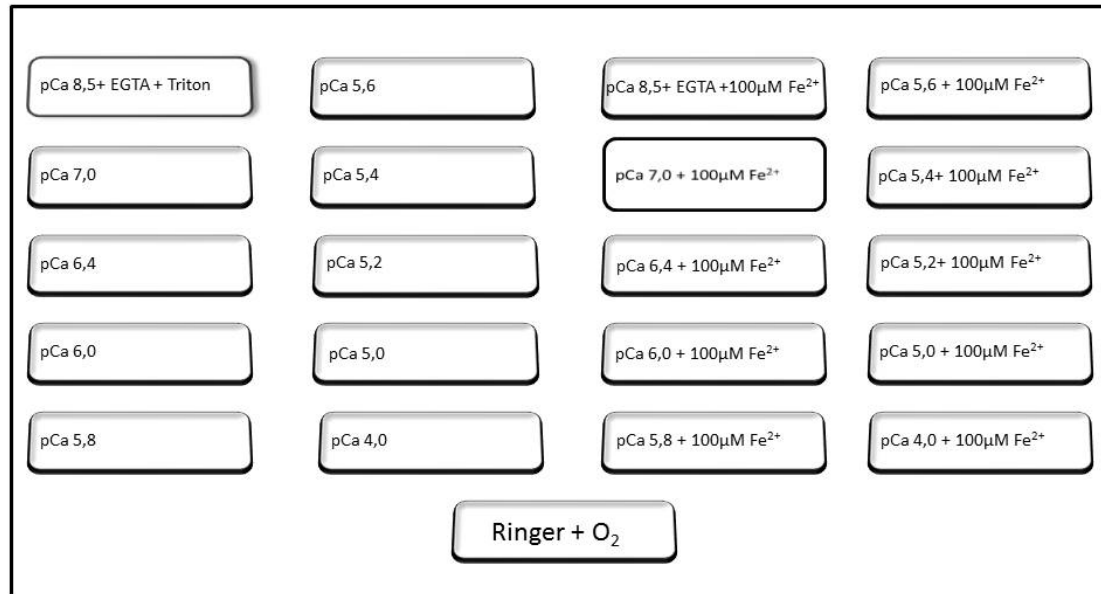


Figura 9. Esquema representativo do protocolo de avaliação da responsividade do músculo papilar ao Ca^{2+} . No painel superior, ilustração da placa contendo as câmaras preenchidas com as soluções em diferentes pCa. O músculo era mantido em cada câmara até atingir o platô de força desenvolvida como ilustrado no painel inferior.

3.2.2. Avaliação do estresse oxidativo miocárdico

3.2.2.1. Papel das EROs nos efeitos agudos do Fe^{2+} sobre a contratilidade do músculo papilar

Para avaliar a participação de EROs nos efeitos do ferro sobre a mecânica miocárdica, os protocolos descritos anteriormente foram realizados frente a co-incubação de Fe^{2+} e dos seguintes antioxidantes:

- Catalase 30 U/mL: conversor de H_2O_2 em H_2O e O_2
- DMSO (dimethylsulfoxide) 100mM: varredor de OH^\bullet (ESPARZA et al., 2015; FRANCO; PANAYIOTIDIS; CIDLOWSKI, 2007)
- Tempol(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 100 μM : mimético da enzima superóxido dismutase

3.2.2.2. Avaliação “in situ” do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela técnica de fluorescência com dihidroetideo

A fim de confirmar o efeito agudo de Fe^{2+} sobre a produção local de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE). O DHE é um derivado do etídio que em contato com $\text{O}_2^{\bullet-}$, oxida-se e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha.

Os músculos papilares, após os protocolos de contratilidade, foram mantidos por 1 hora em solução Krebs-Henseleit com sacarose 30%. Posteriormente, foram congelados em meio adequado (meio de congelamento) e mantidas a -80°C até o dia do experimento. As amostras foram cortadas no criostato em segmentos com 10 μm de espessura, colocados em lâminas gelatinizadas e secas em estufa a 37°C durante 30 minutos. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs-HEPES (Para 100 ml de Krebs: 29,4 mg de CaCl_2 , 759 mg de NaCl, 41,7 mg de KCl, 4,9 mg de MgCl_2 , 197,8 mg de HEPES e 198,2 mg de glicose) por 30 minutos em uma câmara úmida à 37°C . Decorridos os 30 minutos, o Krebs-HEPES foi escoado e o excesso seco. Em seguida, foi realizada incubação com DHE 2 μM por duas horas na estufa com câmara fechada a 37°C . A luminescência emitida foi visualizada em microscópio fluorescência invertido

(Leica DM 2500) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 568 nm. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ.

3.2.2.3. Avaliação “in situ” do OH[•] pela técnica de fluorescência com hidroxifenil fluoresceína

A fluorescência da hidroxifenil fluoresceína (HPF) foi utilizada para avaliar a formação de radical hidroxila provocada pelo Fe no coração. HPF reage com OH[•] e é convertida em fluoresceína, emitindo fluorescência. As amostras foram processadas do modo descrito acima. As lâminas contendo os cortes foram incubadas com solução de Krebs-HEPES ou Krebs-HEPES acrescido de DMSO 1% por 30 minutos, em câmara úmida. Decorrido esse tempo, a solução foi escorrida e as lâminas secas. Em seguida, foi realizada a incubação com HPF 10µM conforme descrito por SETSUKINAI et al. (2003) por duas horas em câmara protegida da luz a 37° C. A luminescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 515 nm. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ.

3.2.3. Análise “in vitro” da atividade da enzima ATPase miosínica

Para determinar se a exposição ao Fe²⁺ altera a atividade da ATPase miosínica, realizamos um ensaio enzimático como descrito por BREMEL; WEBER, 1975. Os ventrículos sem os átrios foram homogeneizados e a extração da miosina foi realizada em solução tampão (0,3 M KCl em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,5). Após a homogeneização foram acrescentados 14mL/g de tecido de água, gota a gota e os resíduos diluídos filtrados em gaze. O filtrado foi diluído em 18mL/g de tecido de água e centrifugado a 10.000 RPM por 40 minutos. O precipitado foi dissolvido em 0,6M de KCl em tampão, para extração da miosina por ação de força iônica. As etapas de diluição e centrifugação foram repetidas mais duas vezes e o último precipitado obtido foi dissolvido em 0,6 M de KCl e 5 mM HEPES, 50 % de glicerol (v/v) e estocados por 12 horas a -20°C. A atividade da ATPase miosínica foi estimada pela liberação de Pi a partir de 1mM de ATP na presença de HEPES (50 mM), pH

7,0; 0,6MKCl e 5mM CaCl_2 ou 10 mM de EGTA na ausência de Mg^{2+} para exclusão da atividade da Ca^{2+} ATPase do RS. As amostras foram incubadas com ATP por 5 minutos a 30°C e a reação foi iniciada com a adição da amostra ao meio de reação por 8 minutos, sendo posteriormente interrompida através da adição de ácido tricloroacético (TCA 10%). A avaliação da atividade enzimática foi realizada em triplicata e análises em duplicata foram realizadas com adição da enzima após a adição de tricloroacético como fator de correção para a hidrólise não enzimática do ATP. A atividade da ATPase miosínica foi determinada como a concentração (nMol) de Pi liberada por mg de proteína por minuto. A concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry, usando albumina bovina como referência (LOWRY et al., 1951).

3.3. Drogas e reagentes

Ácido clorídrico – HCl (Merck)
 Ácido tricloroacético (Merck)
 Albumina, Soro Bovina (Sigma)
 Álcool polivinílico (Merck)
 Bicarbonato de sódio - NaHCO_3 (Merck)
 Cafeína (B.HERZOG)
 Cloreto de cálcio dihidratado - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
 Cloreto de magnésio Hexahidratado - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
 Cloreto de potássio - KCl (Merck)
 Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)
 Etanol absoluto (Sigma)
 EGTA (sigma)
 Fosfato de sódio monobásico - NaH_2PO_4 (Merck)
 Glicerol (Reagen)
 Glicose (Vetec)
 Heparina sódica (Roche)
 HEPES (Sigma)
 Hidróxido de Sódio (Merck)
 KH_2PO_4 (Merck)
 L-isoproterenol (Sigma)

Molibdato de amônio (Nuclear)
Metanol (Sigma)
Na₂fosfocreatina (Sigma)
Sulfato de Ferro II (Valdequimica)
Tris-HCl (Sigma)
Triton X-100 (VETEC)
Uretana sódica (Sigma)

3.4. Análise estatística

Os resultados foram apresentados na estatística descritiva por média \pm erro padrão da média (EPM). Para estatística inferencial, o nível de significância foi estabelecido em 5%. A comparação entre os grupos foi feita por teste *t* de Student pareado, análise de variância uma e duas vias com medidas repetidas ou completamente randomizada, dependendo da ocasião e do número de situações ou grupos e vias a comparar. Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste *pós-hoc* de Tukey, para localizar as diferenças. Toda a análise e construção gráfica foram realizadas por meio do software *GraphPadPrism 6.0*.

4. Resultados

4.1. Efeitos agudos da administração de diferentes concentrações de Fe^{2+} sobre a contratilidade miocárdica

O efeito promovido pela incubação dos músculos papilares com concentrações crescentes de Fe^{2+} sobre a força desenvolvida está ilustrado na Figura 10. A massa dos músculos papilares (mg) não apresentou diferença entre os grupos (KH: $4,43 \pm 0,4$, KH + Fe 25 μM : $4,2 \pm 0,3$; KH + Fe 100 μM : $4,02 \pm 0,4$; KH + Fe 1000 μM : $4,0 \pm 0,5$). Como pode ser observado, o comprometimento agudo da força provocado pelo Fe^{2+} segue um comportamento concentração-dependente e não é revertido quando voltamos a expor os papilares à solução KH livre de Fe^{2+} por 30 minutos. Ademais, analisamos também o tempo necessário para o decaimento da força e como demonstrado na figura 10B, a força do músculo exposto a Fe^{2+} também apresenta um decaimento tempo-dependente, e que já atinge valores menores que o basal entre 20 e 40 minutos, dependendo da concentração.

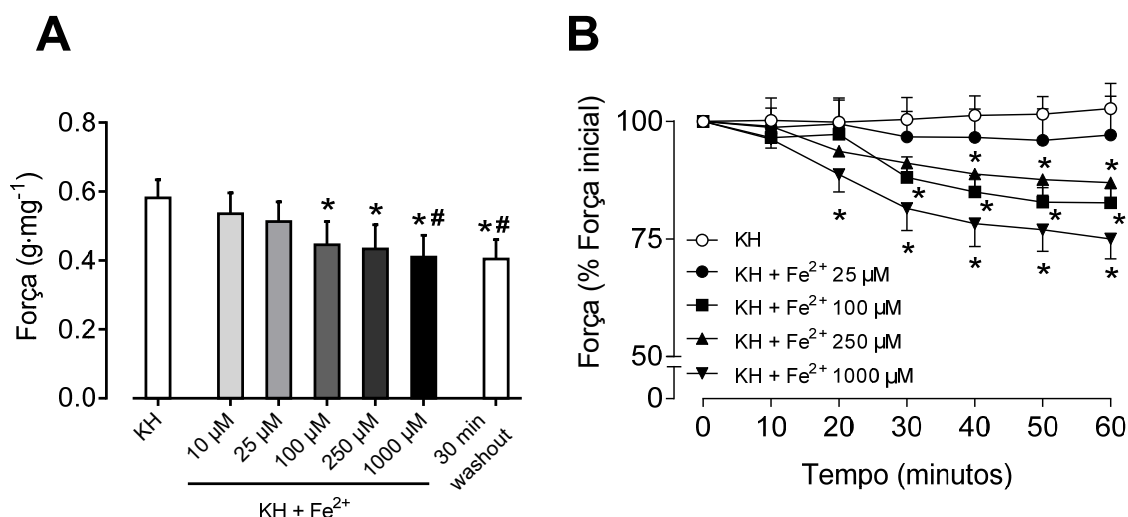


Figura 10. Efeitos da incubação aguda de Fe^{2+} na contratilidade de miocárdio de ratos. (A) Efeito de diferentes concentrações de Fe^{2+} sobre a força desenvolvida de músculos papilares. Cada condição foi mantida durante 30 minutos. (B) Força desenvolvida na ausência e na presença de várias concentrações de Fe^{2+} avaliada ao longo de 60 minutos. A força de todos os grupos foi normalizada pela força da linha de base (tempo = 0). Barras e símbolos representam médias \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. * $P < 0,05$ vs. KH, # $P < 0,05$ vs. KH + Fe^{2+} 10 μM , realizado por ANOVA uma via (A) e duas vias (B) seguida por teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

A partir destes dados, decidimos investigar os efeitos da exposição ao Fe^{2+} (25 μM , 100 μM e 1000 μM) durante 60 minutos sobre a contratilidade do músculo papilar. Estas concentrações foram eleitas, por representarem condições de normalidade, sobrecarga moderada e sobrecarga severa de ferro sérico em mamíferos. A concentração de 250 μM não foi contemplada nesta análise por ter apresentado efeito muito semelhante à concentração de 100 μM nos protocolos anteriores. As concentrações de 100 μM e 1000 μM provocaram depressão contrátil, enquanto 25 μM não alterou a geração de força pelo músculo papilar (Figura 11A). Nenhuma das concentrações causou prejuízo significativo, do ponto de vista estatístico, nas derivadas positiva e negativa (Figuras 11B e C) e nos tempos para o pico de força (KH: 162 ± 9.6 , KH + Fe 25 μM : 147 ± 4.0 ; KH + Fe 100 μM : 141.2 ± 6.8 ; KH + Fe 1000 μM : 157 ± 5.4) e para 50% do relaxamento (KH: 113.9 ± 6.8 ; KH + Fe 25 μM : 97.5 ± 7.7 , KH + Fe 100 μM : 100.6 ± 3.0 ; KH + Fe 1000 μM : 96.4 ± 5).

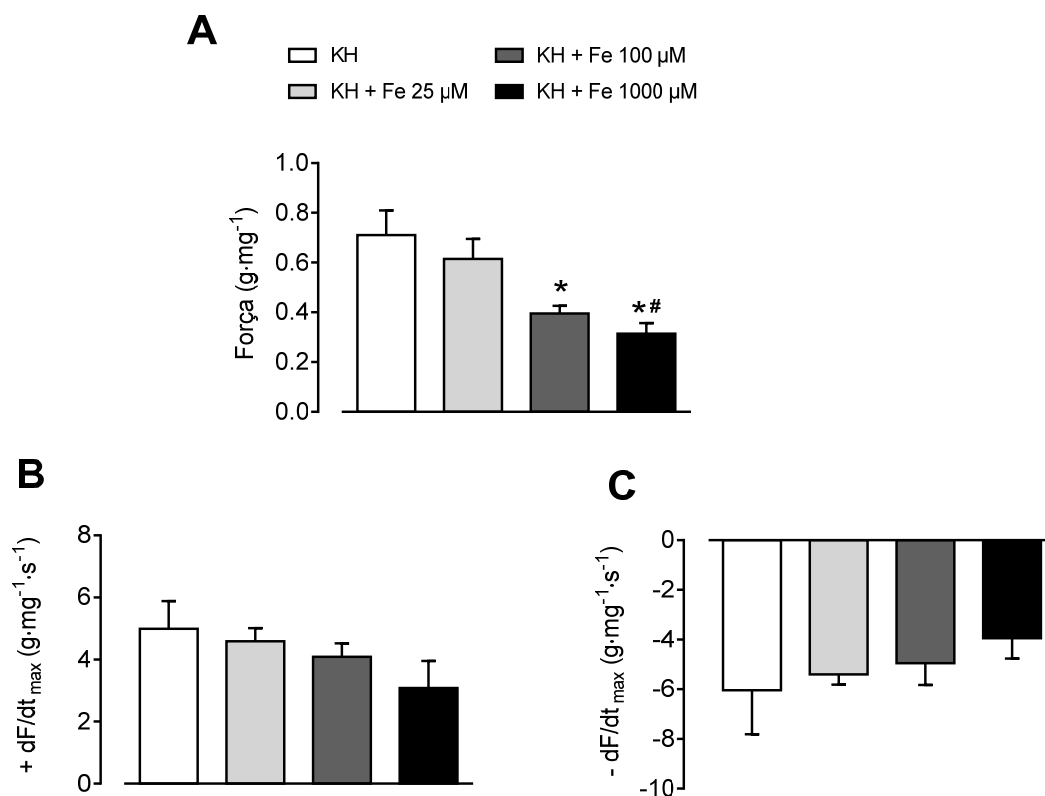


Figura 11. Força desenvolvida e primeiras derivadas de desenvolvimento de força durante as incubações agudas de Fe^{2+} . (A) a força desenvolvida em $L_{\text{máx}}$, normalizada pelo peso do músculo. (B) Derivada máxima positiva e (C) derivada máxima negativa da força ($+dF/dt_{\text{máx}}$ e $-dF/dt_{\text{máx}}$, respectivamente). As barras representam a média \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. *P < 0,05 vs. KH, #P < 0,05 vs. KH + Fe 25 μM , realizado por ANOVA uma via seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

O prejuízo da capacidade de geração de força pelos papilares, quando expostos às concentrações de 100 μM e 1000 μM de Fe^{2+} , se manteve também quando foram avaliadas as respostas inotrópicas ao isoproterenol (Figura 12A) e ao aumento do Ca^{2+} extracelular (Figura 12B). A Potenciação pós-pausa não se alterou em nenhuma das concentrações de Fe^{2+} (Figura 11C), enquanto a contração dependente do influxo transsarcolemal de Ca^{2+} estava significativamente prejudicada quando o papilar foi exposto ao Fe^{2+} a 1000 μM (Figura 12D).

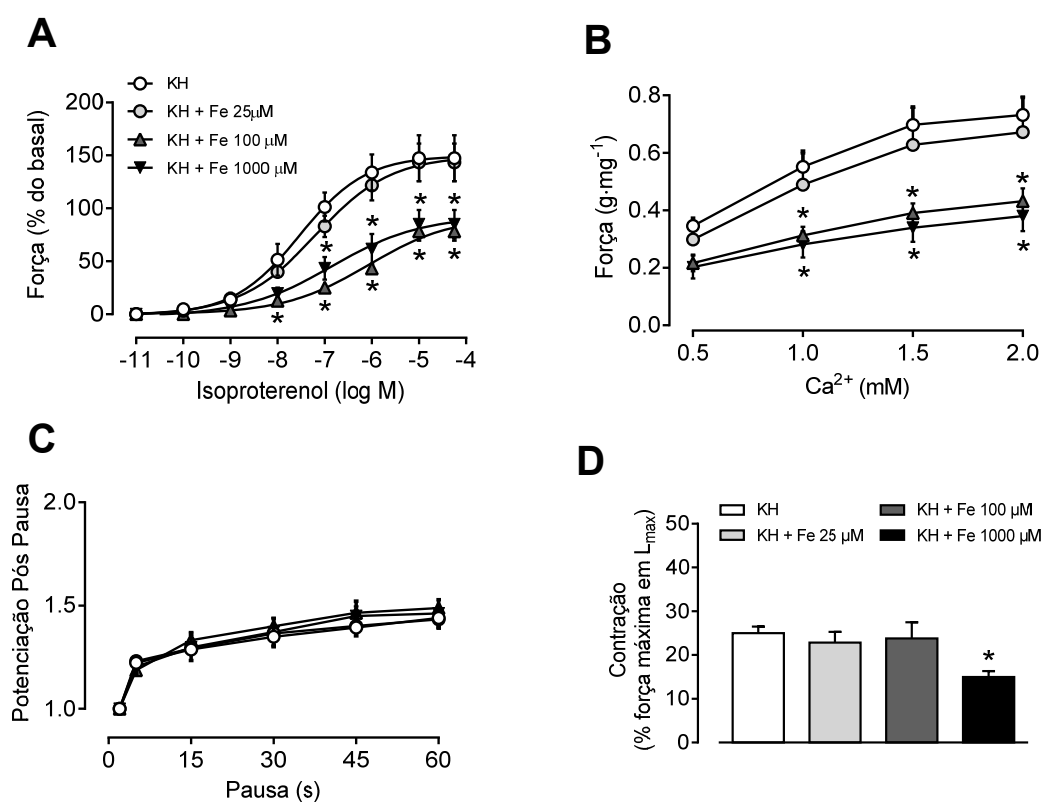


Figura 12. Efeitos da incubação aguda de Fe^{2+} 25, 100 e 1000 μM sobre a resposta contrátil a diferentes protocolos experimentais: (A) Resposta inotrópica do músculo cardíaco ao isoproterenol apresentada pela porcentagem de alteração de força, em relação com as condições basais. (B) Força desenvolvida durante incrementos de concentração de Ca^{2+} na solução nutritora. (C) Efeito do aumento progressivo da duração na pausa do estímulo na contração relativa desenvolvida pelos músculos papilares. A potenciação pós-pausa é expressa como uma proporção entre as contrações antes e depois da respectiva pausa. (D) Contração dependente do influxo transsarcolemal de Ca^{2+} representada como a porcentagem de contração estabilizada em solução com 1,25 mM de Ca^{2+} . Barras e símbolos representam médias \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. * $P < 0,05$ vs. KH, $^{\#}P < 0,05$ vs. KH + Fe^{2+} 25 μM , e $^+P < 0,05$ vs. KH + Fe^{2+} 100 μM realizado por ANOVA uma via (D) ou duas vias (A-C) seguida de pós-teste de Tukey para comparações múltiplas.

4.2. Avaliação do envolvimento das EROs nos efeitos agudos do Fe^{2+} sobre a contratilidade miocárdica de ratos

Como é sabido que o ferro é catalizador da geração de EROs, investigamos a participação do estresse oxidativo nos efeitos provocados pelo Fe^{2+} . A depressão contrátil causada pela exposição ao Fe^{2+} nas concentrações mais altas foi revertida pela catalase (Fe 1000 μM) e DMSO (Fe 100 μM e Fe 1000 μM), como ilustrado na Figura 13. Em ambos os casos, quando co-incubado com os antioxidantes mencionados, o Fe^{2+} não foi capaz de reduzir a força desenvolvida. Entretanto, a co-incubação com TEMPOL não foi capaz de modificar os efeitos do ferro em nenhuma concentração.

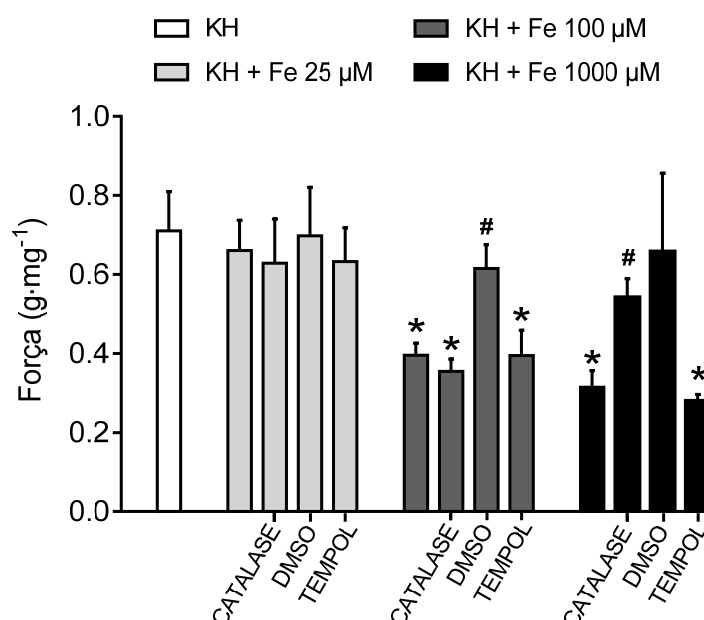


Figura 13. Efeitos de varredores de EROs na força desenvolvida pelos músculos papilares expostos ao Fe^{2+} . A catalase (3000 U), DMSO (100 mM) e TEMPOL (1 mM) foram co-incubadas com Fe^{2+} 25, 100 e 1000 μM . As barras representam a média \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. *P < 0,05 vs. KH, #P < 0,05 versus o respectivo KH + Fe^{2+} sem antioxidante, realizado por ANOVA uma via seguida de pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

De maneira semelhante, os efeitos promovidos pelo Fe^{2+} 100 μM sobre a resposta contrátil ao Ca^{2+} foram impedidos pela co-incubação com DMSO, mas não com Catalase e TEMPOL, enquanto os efeitos do Fe^{2+} 1000 μM foram impedidos tanto pela co-incubação com DMSO quanto com Catalase, mas não com TEMPOL (Figura 14A-C). De maneira interessante, a redução na contração miocárdica dependente do influxo transsarcolemal de Ca^{2+} , sugerida pela contração após repouso de estímulos

com as preparações incubadas com cafeína, induzida pelo Fe^{2+} 1000 μM não fora influenciada pela co-incubação com qualquer antioxidante (Figura 14G). Finalmente, a potenciação pós-pausa, que não fora influenciada pelo Fe^{2+} em nenhuma concentração, tampouco foi modificada pela co-incubação com qualquer dos antioxidantes utilizados (Figura 14 D-F).

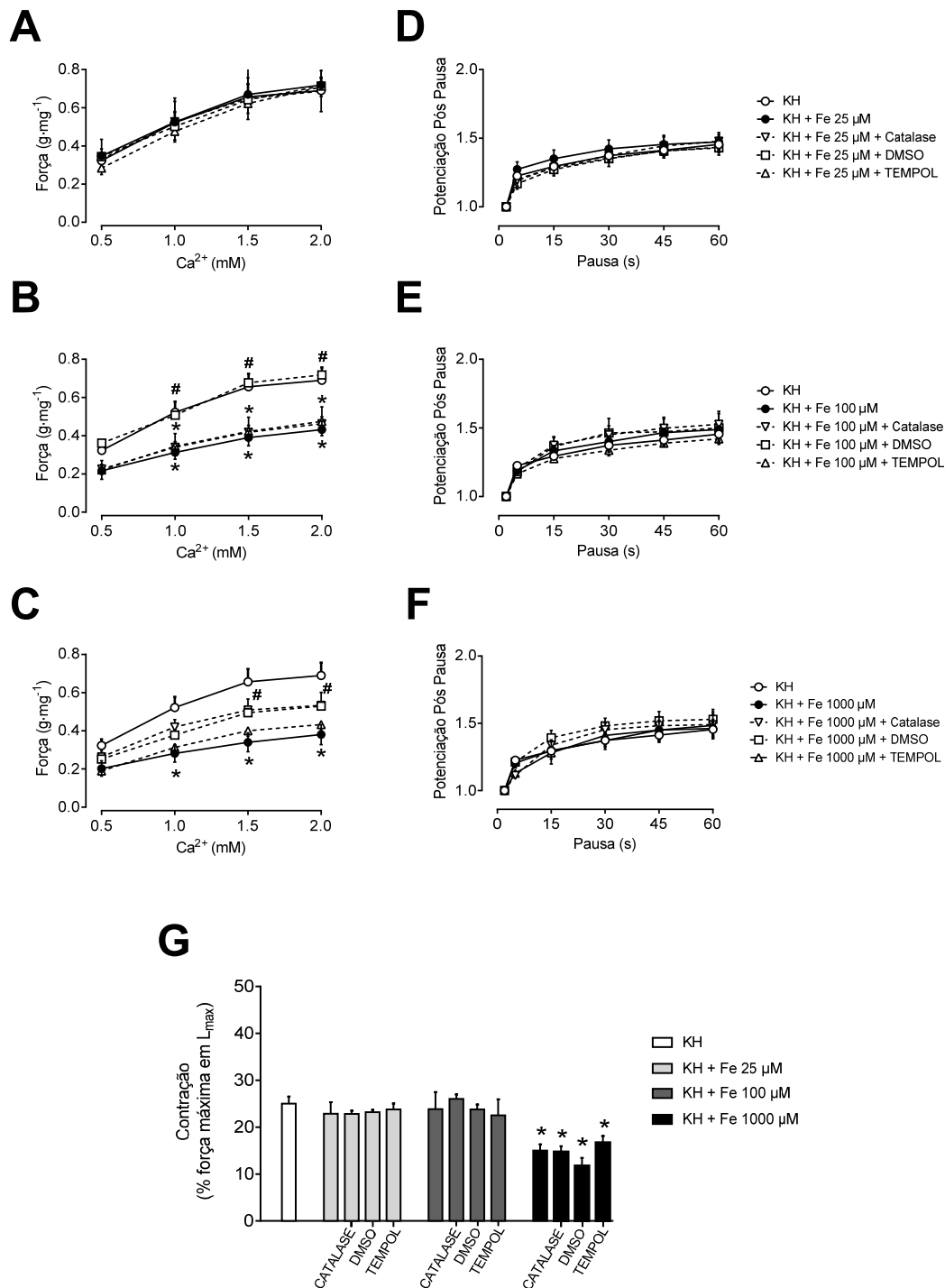
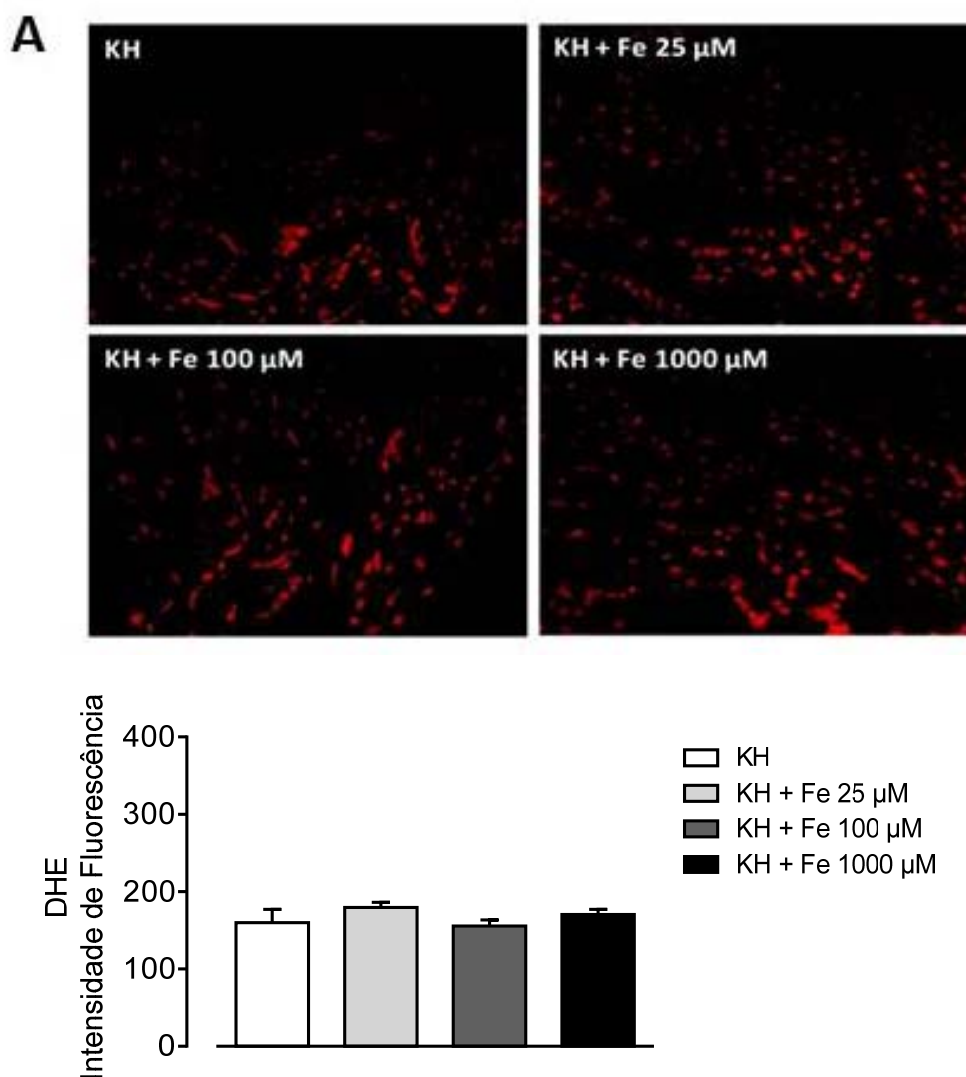


Figura 14. Efeitos de varredores de EROs na resposta contrátil em diferentes protocolos experimentais durante a incubação de Fe^{2+} . Catalase (3000 U), DMSO (100 mM) e TEMPOL (1 mM) foram co-incubadas com de Fe^{2+} 25, 100 e 1000 μM e a força desenvolvida durante

aumento da concentração de Ca^{2+} na solução nutritora (A-C), a potenciação pós-pausa de força (D-F) e a contração dependente de influxo transsarcolemal Ca^{2+} (G) foram avaliadas. Barras e símbolos representam médias \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. *P <0,05 vs. KH, #P <0,05 vs o respectivo KH + Fe^{2+} sem antioxidante, realizado por ANOVA uma via (G) ou duas vias (A-F) seguida por pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

4.3. Avaliação da produção *in situ* de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot}

A produção *in situ* de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} está representada na Figura 15. Conforme os resultados funcionais com a incubação com TEMPOL demonstravam, não há alteração na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Todavia, também em concordância com os efeitos da incubação com DMSO para eliminar os efeitos do OH^{\cdot} , a detecção de OH^{\cdot} aparece aumentada na administração aguda de ferro numa relação concentração–dependente.



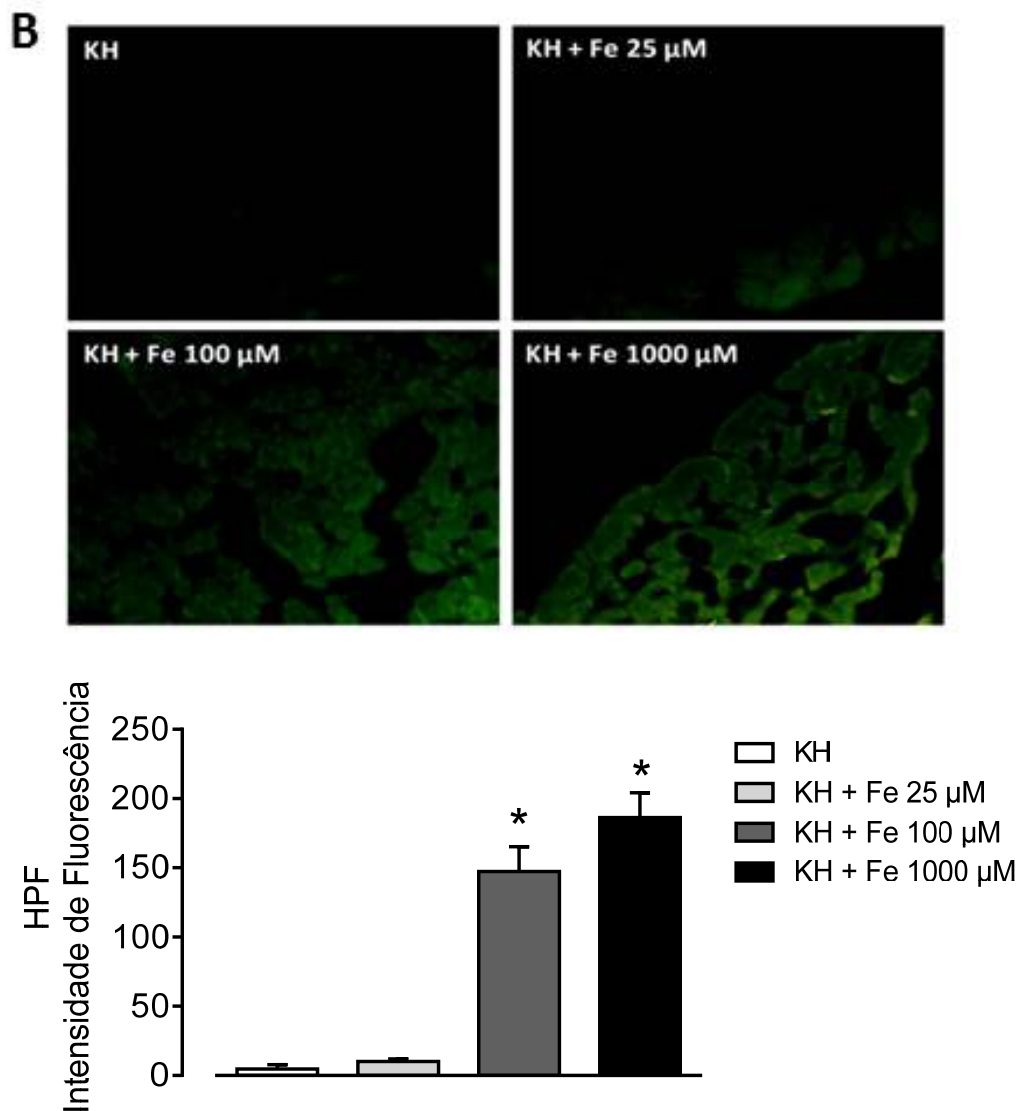


Figura 15. Medidas *in situ* de ânion superóxido (A) e radical hidroxila (B) após incubação aguda com Fe^{2+} . Os painéis superiores mostram microfotografias fluorescentes representativas de secções do músculo papilar marcadas com dihidroethidio (DHE, em vermelho) ou hidroxifenil fluoresceína (HPF, em verde). A análise quantitativa de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (em A) e OH^{\bullet} (em B) da produção ou biodisponibilidade também está demonstrada no gráfico de barras (média \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. * $P < 0,05$ vs. KH, realizado por ANOVA de uma via seguida de pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

4.4. Efeitos agudos da administração de Fe^{2+} sobre a atividade da ATPase miosínica

Para compreender melhor como o Fe^{2+} compromete o desenvolvimento da força contrátil, avaliamos a atividade da ATPase miosínica e observamos

que ela se encontra significativamente reduzida nas duas concentrações mais altas de Fe^{2+} (Figura 16).

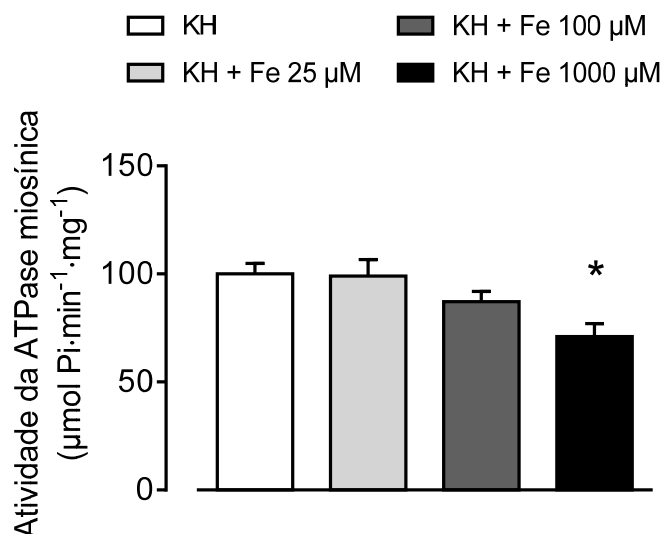


Figura 16. Efeitos de incubação Fe^{2+} aguda sobre a atividade de ATPase da miosina. As barras representam a média \pm EPM. KH: solução de Krebs-Henseleit. * $P < 0,05$ vs. KH, # $P < 0,05$ versus o respectivo KH + Fe^{2+} 25 μM , realizado por ANOVA uma via seguida pelo pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

4.5. Efeitos agudos da administração de Fe^{2+} sobre a sensibilidade miofilamentar ao Ca^{2+}

Na fibra descascada, cujas membranas lipídicas foram desintegradas com o detergente Triton X-100, a capacidade de geração de força pelo músculo frente ao aumento progressivo da concentração de Ca^{2+} é forte indicativo da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} mioplasmático. Como observado na figura 16A, em que a contração foi normalizada pela força máxima desenvolvida por cada músculo na determinada situação, a curva força-pCa foi deslocada para a direita pela incubação aguda com Fe^{2+} 100 μM . Reforçando, a pCa_{50} (pCa em que o músculo desenvolveu 50% de sua força máxima) foi significativamente reduzida.

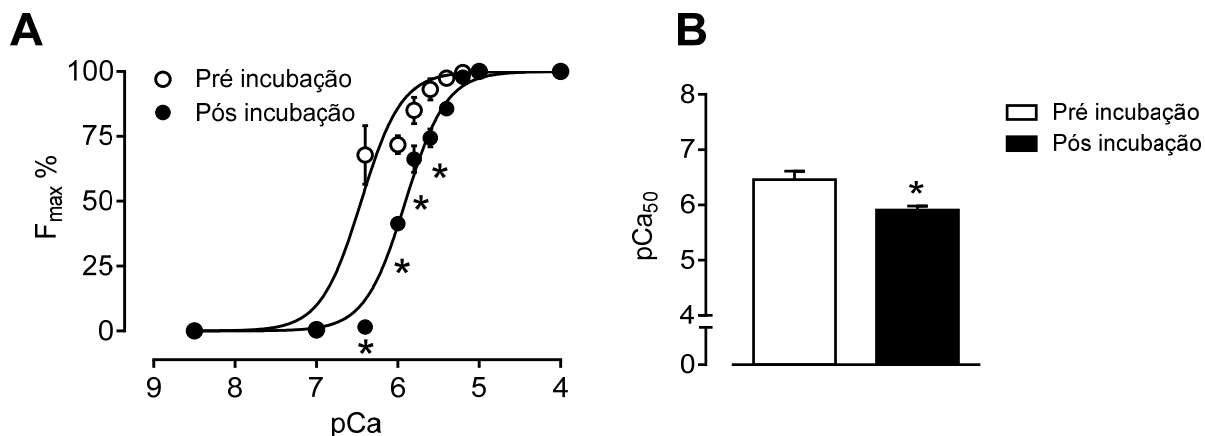


Figura 17. Efeito da incubação aguda com Fe^{2+} sobre a relação força-pCa de músculos papilares com membranas solubilizadas com Triton X-100. (A) Curvas de concentração-resposta ao Ca^{2+} ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$) antes e depois da incubação com $100 \mu M$ de Fe^{2+} . Os dados foram normalizados por F_{max} de cada músculo. Em B, o efeito da incubação com Fe^{2+} na concentração de Ca^{2+} necessária para a metade força máxima (pCa_{50}) foi testada. As barras e os símbolos representam média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs. pré incubação com Fe^{2+} realizado por ANOVA duas vias seguida de pós teste de Tukey para comparações múltiplas (em A) ou pelo teste t de Student para amostras pareadas (em B).

4. DISCUSSÃO

Nós demonstramos que a exposição aguda ao Fe^{2+} é capaz de reduzir a força do músculo papilar de ratos por prejudicar o influxo e a resposta inotrópica ao Ca^{2+} e que estes efeitos são dependentes da concentração de Fe^{2+} e do tempo de exposição. Além disso, demonstramos também que a exposição a altas concentrações de Fe^{2+} estão associadas ao estabelecimento de estresse oxidativo, que é capaz de mediar algumas das ações do Fe^{2+} . De fato, Artman et al publicou uma série estudos (ARTMAN; OLSON; BOERTH, 1982; ARTMAN et al., 1984a, 1984b) sobre os efeitos da exposição aguda de papilares de coelho a 1,8 mM Fe^{2+} in vitro (1,8 vezes maior que nossa concentração mais alta) e administração intraperitoneal aguda de 200 mg/ kg. Em cultura de cardiomiócitos, a exposição a citrato de amônio férrico resultou em inotropismo e cronotropismo negativos (MOREB; HERSHKO; HASIN, 1988). De modo semelhante ao descrito pelos estudos citados, nossos resultados apresentam efeito inotrópico negativo provocado pela exposição ao Fe^{2+} .

O decaimento da força parece estar diretamente relacionado ao aumento da concentração de Fe^{2+} e ao tempo de exposição. Em nosso estudo, já foi possível identificar prejuízo significativo da força após 30 minutos de exposição a 100 μM de Fe^{2+} e 20 minutos na concentração de 1000 μM e este prejuízo é progressivo com o passar do tempo até 60 minutos de exposição. Um estudo anterior ao nosso demonstrou o mesmo efeito concentração e tempo dependente da exposição ao ferro. Neste trabalho, após uma injeção intraperitoneal de ferro-dextrano a concentração no coração aumentava conforme o decorrer do tempo até 6 horas após a aplicação e que a formação de aldeídos tóxicos estava relacionada à dose de ferro aplicada (BARTFAY et al., 2000). Considerando que a presença de ferro e a formação cumulativa de radicais livres aumentam ao longo do tempo, parece claro que o estresse oxidativo condicione esse efeito tempo-dependente sobre a contratilidade miocárdica que encontramos neste estudo in vitro.

Além disso, observamos que o efeito depressor do Fe^{2+} sobre a contratilidade do músculo papilar não foi revertido após a lavagem com solução livre de ferro, sugerindo duas possibilidades: que o ferro interiorizado

provavelmente não seja facilmente extrusado pelo músculo e, dessa maneira fique armazenado nos miócitos continuando seus efeitos; ou que independente disso os efeitos danosos causados sobre o metabolismo e/ou o processo contrátil sejam irreversíveis. O grupo de Artman e colaboradores também já havia descrito estairreversibilidade do efeito do ferro em músculos papilares de coelhos após lavagem ou quelação do ferro com desferoxamina (ARTMAN et al., 1984a) e demonstrado que após apenas 30 minutos da injeção de Fe^{2+} os animais já desenvolviam acidose sistêmica (ARTMAN; OLSON; BOERTH, 1982). Nesse sentido, é sabido que a acidose, assim como a hipóxia, são fatores moduladores não só da sensibilidade ao Ca^{2+} mas como da própria capacidade contrátil. Contudo, no presente trabalho acreditamos que essas condições foram evitadas, pois todos os experimentos foram realizados em temperatura e oxigenação adequadas para evitar a hipóxia, e tanto o pH extracelular (avaliado pela solução nutritora dos papilares intactos) quanto intracelular (avaliada pelo pH da solução dos papilares com membranas celulares removidas) não foram alterados entre os grupos.

Embora, em nosso estudo não tenha havido prejuízo significativo das derivadas máxima e mínima, nossos resultados mostram que existe uma tendência no comprometimento das mesmas. De fato, as derivadas indicam a relação entre o desenvolvimento de força e o tempo necessário para realizar a contração e o relaxamento. Nós mostramos que a exposição a 100 e 1000 μM Fe^{2+} compromete a geração de força sem diminuir TP e TR, o que resulta em derivadas numericamente menores.

Visto que o impacto agudo do ferro sobre a força de contração do músculo cardíaco já está bem estabelecido, o principal objetivo do nosso estudo foi investigar, pela primeira vez, o efeito de diferentes concentrações em alguns pontos específicos do processo de acoplamento excitação-contração cardíaco. É importante ressaltar que para tal objetivo, nós usamos apenas três concentrações: 25 μM , que representa a concentração equivalente ao nível sérico encontrado em homens e ratos saudáveis (20-30 μM) e as concentrações mais altas 100 μM e 1000 μM , correspondentes a níveis séricos em situações de sobrecarga. Níveis séricos de Fe^{2+} entre 60-90 μM nas primeiras horas pós-ingestão de sais de Fe^{2+} já são indicativos de sobrecarga e níveis maiores que 180 μM sugerem intoxicação aguda com risco de falência hepática e choque

circulatório (CHENEY et al., 1995; MARQUES et al., 2015; SIPAHI et al., 2002; TENENBEIN; KOPELOW; DESA, 1988).

Como esperado, nossos resultados indicam que 25 μM Fe^{2+} não modifica nenhum dos parâmetros analisados, em relação ao grupo de papilares não expostos ao ferro, tampouco cursa com alterações na produção local de EROs e na atividade da ATPase miosínica quando comparados as amostras sem a presença de Fe^{2+} . Todavia, nas concentrações equivalentes a situações de intoxicação, 100 e 1000 μM de Fe^{2+} , o prejuízo na contratilidade do músculo papilar dos ratos foi associada a redução em diversos parâmetros relacionados ao processo contrátil.

Tendo em vista que a função contrátil do músculo cardíaco depende do influxo de Ca^{2+} , da quantidade de cálcio disponibilizada pelo RS e da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} intracelular, avaliamos a força de contração do papilar com protocolos que avaliam indiretamente estes três pontos do acoplamento excitação-contração.

O protocolo que avalia a contração dependente do Ca^{2+} a partir do meio extracelular sugere que apenas a concentração de 1000 μM de Fe^{2+} é capaz de reduzir a participação deste influxo sobre a contração. Este resultado reforça a ideia de que em condições de sobrecarga, principalmente em grandes concentrações, o Fe^{2+} parece competir com o Ca^{2+} pelos canais do tipo T e do tipo L no cardiomiócito (CHATTIPAKORN et al., 2011; OUDIT et al., 2003, 2006). É bem conhecido que metais de transição como Ni^{2+} , Co^{2+} e Mn^{2+} (KOHLEHARDT et al., 1973) são capazes de atravessar a membrana pelo canal para Ca^{2+} do tipo L. Oudit (2003) demonstrou que o bloqueio deste canal é capaz de diminuir o acúmulo intracelular e a disfunção cardíaca em ratos com sobrecarga crônica de Fe^{2+} . Assim, a ideia de que os efeitos do Fe^{2+} dependem do seu influxo para o cardiomiócito é suportada pelo fato que em condições de sobrecarga, além de entrar através do DMT-1 e do complexo Tf-TfR, o Fe^{2+} pode atravessar a sarcolema através dos numerosos canais para Ca^{2+} (CHENG et al., 2004; OUDIT et al., 2003, 2006). Vale lembrar que o influxo transsarcolemal de Ca^{2+} , prejudicado pela sobrecarga aguda de Fe^{2+} interfere não só na participação direta deste íon sobre a contração (avaliado pelo protocolo por nós utilizado) mas, principalmente, no mecanismo de liberação do RS de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} .

A potenciação pós-pausa é um reflexo, ainda que indireto, da função do RS em recaptar, armazenar e liberar Ca^{2+} em balanço aos mecanismos responsáveis pela extrusão do Ca^{2+} . Ao contrário do que aconteceu na redução na força desenvolvida em condições basais nas respostas a estímulos inotrópicos, a potenciação pós-pausa não foi alterada frente à incubação com Fe^{2+} em nenhuma das concentrações estudadas. Quando exposto a 100 μM de Fe^{2+} , o influxo de Ca^{2+} e consequente gatilho para liberação pelo RS provavelmente estão preservados. Já na exposição a 1000 μM , o influxo parece estar comprometido e, possivelmente isto implicaria numa menor ativação do RyR, e em última análise, em redução da potenciação pós-pausa. Entretanto, outros fatores que não avaliamos podem estar preservados ou até mesmo acentuados nesta condição, como a atividade da fosfolambam, da SERCA e do NCX e desta maneira poderiam mascarar essa liberação prejudicada de Ca^{2+} pelo RS. Nesse sentido, sabe-se que o Fe^{2+} pode agir como modulador do RyR (KIM; GIRI; PESSAH, 1995b) e que EROs podem aumentar a fosforilação do fosfolambam, atividade da SERCA e NCX (LUO et al., 2006). Contudo, a coincubação com antioxidantes não resultou em nenhuma alteração da potenciação pós-pausa. Isso levanta a possibilidade de que o ferro possa modular a ação destas proteínas que em conjunto, influenciarão a mantida função do RS em balanço aos processos de extrusão do Ca^{2+} no cardiomiócito.

Conhecidamente, os metais de transição participam de reações de oxidação e redução, sendo que o ferro é um elemento envolvido no metabolismo oxidativo, capaz de reagir e catalisar a formação de EROs. Nesse sentido, o papel do estresse oxidativo na disfunção contrátil está bem estabelecida (BURGOYNE et al., 2012) e estudos demonstraram que o aumento do estresse oxidativo é mediador dos efeitos do ferro sobre o sistema cardiovascular, especialmente nas cardiomiopatias (ARTMAN et al., 1984a; BARTFAY et al., 2000). De acordo com nossos protocolos com os diferentes antioxidantes, o OH^{\bullet} é a principal ERO envolvida nos efeitos do Fe^{2+} numa situação equivalente a uma sobrecarga moderada, já que a incubação com DMSO atenuou as alterações provocadas pelo Fe^{2+} 100 μM . Quando 1000 μM de Fe^{2+} foram adicionados à solução nutritiva, tanto o DMSO quanto a catalase foram efetivos, indicando que a ação do H_2O_2 também estava presente

numa situação equivalente a intoxicação severa. A oxidação de proteínas é um processo de sinalização fisiológica e regula a ação proteica e a principal espécie reativa envolvida neste processo de oxidação/ sinalização é o H_2O_2 (JOHNSTON; LEHNART; BURGOYNE, 2015). O envolvimento do H_2O_2 na toxicidade do ferro é estabelecido pela reação de Fenton (WINTERBOURN, 1995b) e a quelação de ferro diminui a morte de células expostas ao H_2O_2 (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENECHINI, 1984). No coração, a produção elevada destes radicais está associada a modificações no processo de acoplamento excitação-contração, alterando a ciclagem e a sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (GUDJONCIK et al., 2014; SEDDON; LOOI; SHAH, 2007). ROCHETTE et al. (2011) encontraram uma correlação significativa entre a peroxidação lipídica e o conteúdo de ferro no átrio direito de pacientes com cardiomiopatia dilatada, reforçando a ideia de que alterações nos níveis de ferro e o estresse oxidativo estão de fato associados a disfunções cardíacas.

Confirmando nossos resultados com os ensaios funcionais, os músculos papilares incubados com as concentrações altas de Fe^{2+} tiveram produção aumentada de OH^\bullet sem alterar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, medidas *in situ* pela fluorescência de HPF e DHE, respectivamente. É digno de nota que a incubação dos papilares com o TEMPOL, um mimético da superóxido dismutase responsável pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, não foi eficiente em evitar quaisquer alterações de contratilidade promovidas pelo Fe^{2+} .

Contudo, o estudo de Artman et al (1984) com os músculos papilares de coelhos expostos a 1,8 mM de Fe^{2+} evidenciou que o $\text{O}_2^{\bullet-}$ também age mediando os efeitos danosos da exposição ao metal. Não podemos descartar por completo a produção desse radical, mas acreditamos que apesar da primeira etapa da reação de Fenton ser bidirecional e potencialmente poder cursar com a conversão de O_2 em $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelo Fe^{2+} , da mesma forma o ferro pode catalizar a reação entre esse $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 formado, gerando novamente O_2 (reação de Haber-Weiss).

Como já exposto, é sabido que EROs são capazes de prejudicar a função contrátil através de diversos mecanismos, incluindo alterações no processo de acoplamento excitação-contração. A exposição de cardiomiócitos a OH^\bullet e H_2O_2 é capaz de reduzir o transiente de Ca^{2+} e alterar a sensibilidade ao Ca^{2+} disponível (FEARON et al., 1999; GILL; MCKENNA; CAMM, 1995). Por

outro lado, as incubações com Fe^{2+} 100 μM e 1000 μM reduziram a resposta contrátil, dos papilares com membranas intactas, ao aumento da concentração de Ca^{2+} na solução nutritora. A responsividade do músculo cardíaco ao Ca^{2+} é resultado final da integridade: das correntes de influxo deste íon pelo sarcolema, da função do RS, da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} e da cinética de formação de pontes cruzadas (BOLLI; MARBAN, 1999). Apesar de haver conhecidamente uma modulação do manejo do Ca^{2+} por EROs (BURGOYNE et al., 2012), pelo menos em relação ao protocolo utilizado por nós para avaliar a participação do transiente de Ca^{2+} através da membrana sobre a contração miocárdica, a incubação com Fe^{2+} 1000 μM foi capaz de reduzir significativamente este parâmetro, sem que este efeito seja amenizado quando realizamos a co-incubação com antioxidantes. Em outras palavras, pelos nossos resultados podemos inferir que este não é um efeito mediado pela geração de EROs tais como OH^{\bullet} , H_2O_2 ou $\text{O}_2^{\bullet-}$, mas provavelmente por uma competição direta entre Fe^{2+} e Ca^{2+} .

Conhecendo a capacidade de competição entre Fe^{2+} e Ca^{2+} , é admissível especular que não há comprometimento da contração dependente do influxo de Ca^{2+} quando incubamos com 100 μM de Fe^{2+} provavelmente porque esta concentração é 12,5 vezes menor que a concentração de Ca^{2+} da solução nutritora (equivalente a 1250 μM). Por outro lado, com o Fe^{2+} na concentração de 1000 μM a competição é menos desequilibrada. Entretanto, acreditamos que apesar de provavelmente não interferir no transiente de Ca^{2+} através da membrana, 100 μM de Fe^{2+} é capaz de prejudicar outros processos da contração muscular cardíaca, como discutidos a seguir.

Os resultados obtidos com os papilares que tiveram as membranas celulares removidas com Triton-X100 e expostos a Fe^{2+} 100 μM indicam que os efeitos depressores do ferro sobre a contratilidade do músculo papilar envolvem uma significativa diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , visto que pCa_{50} (que indica a pCa em que 50% da $F_{\text{máx}}$ é atingida) está significativamente alterada após a exposição. A pCa_{50} foi reduzida de $6,46 \pm 0,07$ para $5,90 \pm 0,03$, o que significa aumentar a concentração de Ca^{2+} para atingir 50% da $F_{\text{máx}}$ de 0,36 para 1,26 μM (quase 4 vezes). Sabe-se que outros metais divalentes como Pb^{2+} , Cd^{2+} e Mn^{2+} são capazes de se ligar a sítios intracelulares de Ca^{2+} (HABERMANN; RICHARDT, 1986) e já em 1988,

acreditava-se que o comprometimento de força provocado pelo ferro pudesse estar relacionado à menor sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} por competição direta entre os dois elementos e/ou pela mediação de radicais livres (MOREB; HERSHKO; HASIN, 1988). Os radicais livres são capazes de modificar a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} por oxidação das proteínas contráteis ou de proteínas cinases que modulam a contração (HERTELENDI et al., 2008; SANTOS et al., 2011). Como já é conhecido que a exposição de cardiomiócitos a EROs tais como H_2O_2 e OH^\bullet compromete a responsividade ao Ca^{2+} , sem prejuízo do ciclo deste íon, torna-se razoável especular que a formação de EROs mediada pelo Fe^{2+} em elevadas concentrações esteja envolvida no prejuízo da resposta miofilamentar ao Ca^{2+} identificada em nosso estudo. Suportando nossa extrapolação, já foi demonstrado que EROs são capazes provocar modificações na maquinaria contrátil, por meio da oxidação do grupo sulfidril das proteínas contráteis e alterar a sensibilidade ao Ca^{2+} e a atividade da ATPase miosínica (AYDEMIR-KOKSOY et al., 2010; HERTELENDI et al., 2008; KANEKO et al., 1993; SUZUKI et al., 1991). Em consequência, a menor sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} por oxidação implica em menor capacidade de geração de força em cardiomiócitos permeabilizados com Triton (HERTELENDI et al., 2008), assim como existem evidências de que o comprometimento da atividade da ATPase miosínica demonstrada em ratos com insuficiência cardíaca é atenuado pelo pré-tratamento com antioxidantes (MADDIKA et al., 2009). Ainda sobre a ATPase miosínica, já é sabido que a forma iônica de outros metais, como Pb^{2+} e Hg^{2+} é capaz de modificar sua atividade (FURIERI et al., 2011; MOREIRA et al., 2003; VASSALLO et al., 2008). Tendo em vista que o desenvolvimento de força está diretamente relacionado com a atividade da ATPase miosínica, a diminuição desta atividade é um fator determinante da função contrátil, e alterações moleculares dos miofilamentos implicam em disfunção cardíaca (MACHACKOVA; BARTA; DHALLA, 2006).

6. Considerações Finais

Sumariando, a exposição aguda a altas concentrações de Fe^{2+} é capaz de modular a função cardíaca em variados mecanismos do processo de

contração. Esta modulação está relacionada à concentração e ao tempo de exposição, e ainda pode ser efeito direto do Fe^{2+} ou mediado por OH^\bullet ou H_2O_2 .

Dessa maneira, podemos concluir que concentrações elevadas de Fe^{2+} são capazes de prejudicar agudamente a contratilidade miocárdica por ação direta ou mediada por EROs (Figura 18). A ação do Fe^{2+} sobre a capacidade de geração de força pelo músculo papilar do ventrículo esquerdo está associada à diminuição da atividade da ATPase miosínica e da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} , mesmo que a função do RS esteja aparentemente preservada. Além disso, estes efeitos são dependentes do aumento da geração local de EROs, principalmente OH^\bullet e H_2O_2 . Finalmente, na concentração mais elevada, ocorre um significativo prejuízo da função contrátil também pelo comprometimento da participação do influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema, provavelmente por competição do Fe^{2+} com o Ca^{2+} por seus canais, sendo esse evento independente de estresse oxidativo localmente gerado.

Considerando-se que a intoxicação aguda com ferro pode danificar vários órgãos, incluindo o sistema cardiovascular, e sendo esta uma importante causa de morte por intoxicação, embora as condições *in vitro* sejam bastante diferentes das encontradas na clínica, acreditamos que nosso estudo deve estimular pesquisas translacionais e protocolos *in vivo* para desenvolver estratégias adjuvantes na sobrecarga aguda. Ademais, a compreensão dos mecanismos sobre a toxicidade cardíaca produzida por diferentes concentrações de Fe^{2+} , bem como dos alvos no processo de acoplamento excitação-contração, deve ser útil no desenvolvimento de terapias e protocolos de estratificação de risco em casos de envenenamento por ferro.

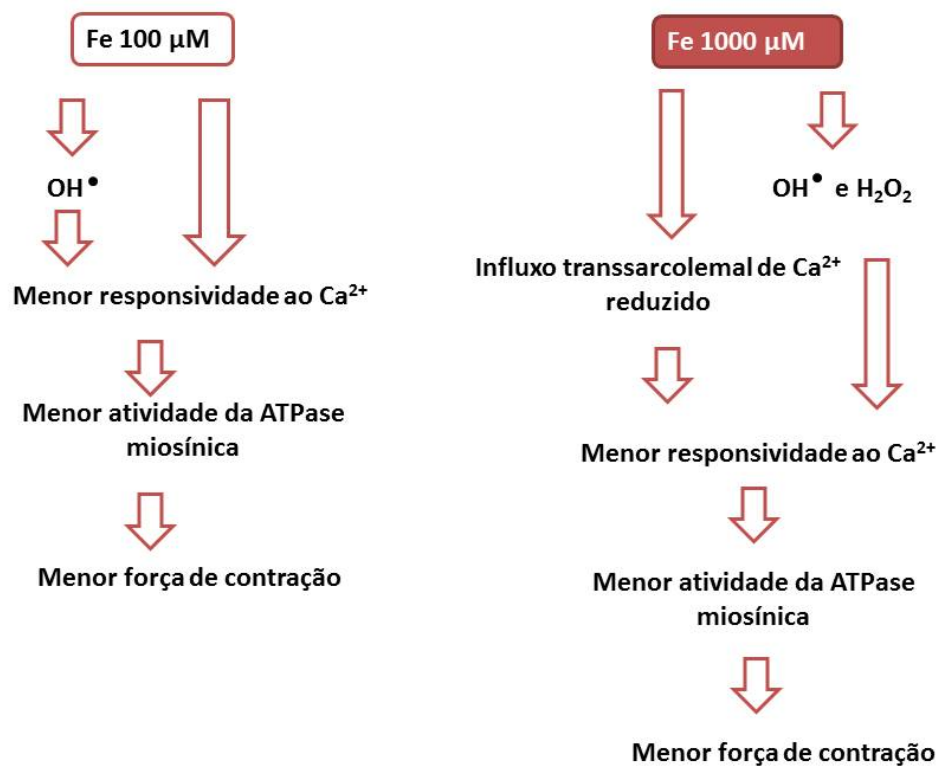


Figura 18. Esquema representativo da ação de altas concentrações de Fe^{2+} sobre pontos do processo de contração do músculo cardíaco.

7. Referências bibliográficas

AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 33, n. 10, p. 940–59, out. 2001.

ARNOLD, T.; LINKE, D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. **BioTechniques**, v. 43, n. 4, p. 427–30, 432, 434 passim, out. 2007.

ARTMAN, M. et al. Acute effects of iron on contractile function in isolated rabbit myocardium. **Developmental pharmacology and therapeutics**, v. 7, n. 1, p. 50–60, jan. 1984a.

ARTMAN, M. et al. Depression of contractility in isolated rabbit myocardium following exposure to iron: role of free radicals. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 72, n. 2, p. 324–32, fev. 1984b.

ARTMAN, M.; OLSON, R. D.; BOERTH, R. C. Depression of myocardial contractility in acute iron toxicity in rabbits. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 329–37, dez. 1982.

AYDEMIR-KOKSOY, A. et al. Antioxidant treatment protects diabetic rats from cardiac dysfunction by preserving contractile protein targets of oxidative stress. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 827–33, set. 2010.

BANNER, W.; TONG, T. G. Iron poisoning. **Pediatric clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 393–409, abr. 1986.

BARDOU-JACQUET, E.; BRISSOT, P. Diagnostic evaluation of hereditary hemochromatosis (HFE and non-HFE). **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 625–35, v, ago. 2014.

BARTFAY, W. J. et al. Cytotoxic aldehyde generation in heart following acute iron-loading. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 14, n. 1, p. 14–20, 2000.

BARUPALA, D. P. et al. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 592,

p. 60–75, 15 fev. 2016.

BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of physiology**, v. 476, n. 2, p. 279–93, 15 abr. 1994.

BERS, D. M. Excitation- contraction coupling. **Nature**. v. 415, n. January, 2002.

BERS, D. M.; SHANNON, T. R. Calcium movements inside the sarcoplasmic reticulum of cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 58, n. 1, p. 59–66, 2013.

BOCALINI, D. S. et al. Remodelamento miocárdico após grandes infartos converte potenciação pós-pausa em decaimento da força em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 3, p. 243–251, mar. 2012.

BOCALINI, D. S.; TUCCI, P. J. F. Developed Force of Papillary Muscle. **International Heart Journal**, v. 50, n. 5 p. 643–652, 2009.

BOLLI, R.; MARBAN, E. Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning. **Physiol Rev**, v. 79, n. 2, p. 609–634, 1 abr. 1999.

BORGNA-PIGNATTI, C. et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. **Haematologica**, v. 89, n. 10, p. 1187–93, out. 2004.

BREMEL, R. D.; WEBER, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 376, n. 2, p. 366–374, fev. 1975.

BUJA, L. M.; ROBERTS, W. C. Iron in the heart. **The American Journal of Medicine**, v. 51, n. 2, p. 209–221, 1971.

BURGOYNE, J. R. et al. Redox Signaling in Cardiac Physiology and Pathology. **Circulation Research**, v. 111, n. 8, p. 1091–1106, 2012.

CALAGHAN, S. C.; BELUS, A.; WHITE, E. Do stretch-induced changes in intracellular calcium modify the electrical activity of cardiac muscle? **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 82, n. 1-3, p. 81–95, jan. .

CHATTIPAKORN, N. et al. Calcium channels and iron uptake into the heart. **World journal of cardiology**, v. 3, n. 7, p. 215–218, 2011.

CHENEY, K. et al. Survival after a severe iron poisoning treated with intermittent infusions of deferoxamine. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, v. 33, n. 1, p. 61–6, jan. 1995.

CHENG, Y. et al. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex Albert Einstein College of Medicine. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 565–576, 2004.

CROTTY, J. J. Acute iron poisoning in children. **Clinical toxicology**, v. 4, n. 4, p. 615–9, 1971.

DE BELCHIOR, A. C. S. et al. MATERNAL PROTEIN RESTRICTION COMPROMISES MYOCARDIAL CONTRACTILITY IN THE YOUNG ADULT RAT BY CHANGING PROTEINS INVOLVED IN CALCIUM HANDLING. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, p. jap.00246.2015, 19 nov. 2015.

ELLEDGE, S. J.; ZHOU, Z.; ALLEN, J. B. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. **Trends in biochemical sciences**, v. 17, n. 3, p. 119–123, 1992.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, n. 6, p. 333–339, jul. 2001.

ESPARZA, A. et al. Iron-induced reactive oxygen species mediate transporter DMT1 endocytosis and iron uptake in intestinal epithelial cells. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 309, n. 8, p. C558–67, 15 out. 2015.

FEARON, I. M. et al. Modulation of recombinant human cardiac L-type Ca²⁺ channel α_1C subunits by redox agents and hypoxia. **The Journal of physiology**, v. 514 (Pt 3, p. 629–37, 1 fev. 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

FINE, J. S. Iron poisoning. **Current Problems in Pediatrics**, v. 30, n. 3, p. 71–90, 2000.

FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M. I.; CIDLOWSKI, J. A. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30452–65, 19 out. 2007.

FUCHS, F.; SMITH, S. H. Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 16, p. 5–10, fev. 2001.

FURIERI, L. B. et al. Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 255, n. 2, p. 193–9, 1 set. 2011.

GANZ, T. Systemic iron homeostasis. **Physiological reviews**, v. 93, n. 4, p. 1721–41, out. 2013.

GILL, J. S.; MCKENNA, W. J.; CAMM, A. J. Free radicals irreversibly decrease Ca²⁺ currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. **European journal of pharmacology**, v. 292, n. 3-4, p. 337–40, 16 mar. 1995.

GKOUVATSOS, K.; PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1820, n. 3, p. 188–202, mar. 2012.

GODT, R. E.; LINDLEY, B. D. Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibers of the frog. **The Journal of general physiology**, v. 80, n. 2, p. 279–97, ago. 1982.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390–397, out. 2008.

GUDJONCIK, A. et al. Iron, oxidative stress, and redox signaling in the cardiovascular system. **Molecular nutrition & food research**, v. 58, n. 8, p. 1721–38, ago. 2014.

HABERMANN, E.; RICHARDT, G. Intracellular calcium binding proteins as targets for heavy metal ions. **T.I.P.S.**, v. 8, n. August, p. 298–300, 1986.

HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601–617, 1995.

HERTELENDI, Z. et al. Oxidation of myofilament protein sulfhydryl groups reduces the contractile force and its Ca^{2+} sensitivity in human cardiomyocytes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 7, p. 1175–84, jul. 2008.

HUGMAN, A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. **Clinical and laboratory haematology**, v. 28, n. 2, p. 75–83, abr. 2006.

JIANG, Y. et al. Maternal iron overload results in liver damage in rat offspring]. **Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research**, v. 44, n. 3, p. 402–6, maio 2015.

JOHNSTON, A. S.; LEHNART, S. E.; BURGOYNE, J. R. Ca^{2+} signaling in the myocardium by (redox) regulation of PKA/CaMKII. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2015.

KANEKO, M. et al. Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 125, n. 2, p. 163–9, 25 ago. 1993.

KIM, E.; GIRI, S. N.; PESSAH, I. N. Iron(II) is a modulator of ryanodine-sensitive calcium channels of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. **Toxicology and applied pharmacology**, 1995.

KOHLHARDT, M. et al. Selective inhibition of the transmembrane Ca^{2+} conductivity of mammalian myocardial fibres by Ni, Co and Mn ions. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 338, n. 2, p. 115–23, 22 jan. 1973.

LE BLANC, S.; GARRICK, M. D.; ARREDONDO, M. Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 302, n. 12, p. C1780–5, 15 jun. 2012.

LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V.; MILL, J. G. The effect of verapamil on potentiated rest contractions in the rat ventricular myocardium. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 21, n. 4, p. 859–62, jan. 1988.

LOFRANO-ALVES, M. S. et al. Eugenol-induced contractions of saponin-skinned fibers are inhibited by heparin or by a ryanodine receptor blocker. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 83, n. 12, p. 1093–1100, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, nov. 1951.

LUO, J. et al. Prolonged oxidative stress inverts the cardiac force-frequency relation: role of altered calcium handling and myofilament calcium responsiveness. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 40, n. 1, p. 64–75, jan. 2006.

MACHACKOVA, J.; BARTA, J.; DHALLA, N. S. Myofibrillar remodeling in cardiac hypertrophy, heart failure and cardiomyopathies. **The Canadian journal of cardiology**, v. 22, n. 11, p. 953–68, set. 2006.

MADDIKA, S. et al. Role of oxidative stress in ischemia-reperfusion-induced alterations in myofibrillar ATPase activities and gene expression in the heart. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 87, n. 2, p. 120–9, fev. 2009.

MAHONEY, J. R. et al. Acute iron poisoning. Rescue with macromolecular chelators. **The Journal of clinical investigation**, v. 84, n. 4, p. 1362–6, out. 1989.

MARET, W. The Metals in the Biological Periodic System of the Elements: Concepts and Conjectures. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 1, jan. 2016.

MARQUES, V. B. et al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. **Life Sciences**, 2015.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **The Biochemical journal**, v. 218, n. 1, p. 273–5, 15 fev. 1984.

MILL, J. G.; VASSALLO, D. V.; LEITE, C. M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 25,

n. 4, p. 399–408, jan. 1992.

MOON, S. N. et al. Establishment of secondary iron overloaded mouse model: evaluation of cardiac function and analysis according to iron concentration. **Pediatric cardiology**, v. 32, n. 7, p. 947–52, 2011.

MOREB, J.; HERSHKO, C.; HASIN, Y. Effects of acute iron loading on contractility and spontaneous beating rate of cultured rat myocardial cells. **Basic research in cardiology**, v. 83, n. 4, p. 360–368, 1988.

MOREIRA, C. M. et al. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 135C, n. 3, p. 269–75, jul. 2003.

MUÑOZ, M.; VILLAR, I.; GARCÍA-ERCE, J. A. An update on iron physiology. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 37, p. 4617–4626, 2009.

NUNES, F. S.; RAIMONDI, A. C.; NIEDWIESKI, A. C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 872–879, dez. 2003.

OLSON, R. D.; BOERTH, R. Depression of Myocardial Contractility Acute Iron Toxicity in Rabbits in Accidental ingestion of iron salts by children continues to be a clinical problem. v. 337, p. 329–337, 1982.

ORGEL, L. E. The origin of life--a review of facts and speculations. **Trends in biochemical sciences**, v. 23, n. 12, p. 491–5, dez. 1998.

OUDIT, G. Y. et al. L-type Ca^{2+} channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1187–1194, 2003.

OUDIT, G. Y. et al. Role of L-type Ca^{2+} channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 5, p. 349–364, 2006.

PAULA, E. V. DE; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Quelação oral de ferro na Beta-Talassemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 1, p. 59–63, mar. 2003.

PONKA, P.; TENENBEIN, M.; EATON, J. W. Chapter 30. 2007.

ROCHETTE, L. et al. Atrial and vascular oxidative stress in patients with heart failure. **Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 497–502, jan. 2011.

ROSSI, E. M. et al. Acute iron overload leads to hypothalamic-pituitary-gonadal axis abnormalities in female rats. **Toxicology letters**, 1 nov. 2015.

ROUAULT, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 8, p. 406–14, ago. 2006.

SANTOS, C. X. C. et al. Redox signaling in cardiac myocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 7, p. 777–793, 2011.

SCHÜMANN, K. et al. Oral administration of ferrous sulfate, but not of iron polymaltose or sodium iron ethylenediaminetetraacetic acid (NaFeEDTA), results in a substantial increase of non-transferrin-bound iron in healthy iron-adequate men. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 128–136, 2012.

SEDDON, M.; LOOI, Y. H.; SHAH, A. M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart**, v. 93, n. 8, p. 903–907, 2007.

SETSUKINAI, K. et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 5, p. 3170–5, 31 jan. 2003.

SIPAHI, T. et al. Acute iron ingestion. **Indian journal of pediatrics**, v. 69, n. 11, p. 947–9, nov. 2002.

SOUZA, M. C.; LOCATELLI, C. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO/ SULFATO FERROSO EM RATOS TRATADOS SUBCRONICAMENTE. **Ágora : revista de divulgação científica**, 11 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.periodicos.unc.br/index.php/agora/article/view/135>>. Acesso em: 24 mar. 2016

STARLING, E. H.; VISSCHER, M. B. The regulation of the energy output of the heart. **The Journal of physiology**, v. 62, n. 3, p. 243–61, 12 jan. 1927.

SUZUKI, S. et al. Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1074, n. 1, p. 95–100, maio 1991.

TENENBEIN, M.; KOPELOW, M. L.; DESA, D. J. Myocardial failure and shock in iron poisoning. **Human toxicology**, v. 7, n. 3, p. 281–4, maio 1988.

TOMÉ-ALVES, R. et al. Hemoglobinas AS/alfa talassemia: importância diagnóstica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 3, p. 388–394, dez. 2000.

VASSALLO, D. V et al. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**, v. 41, n. 9, p. 789–95, set. 2008.

WATSON, W. A. et al. 2003 **Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System**. p. 335–404, 2004.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82-83, n. C, p. 969–974, 1995.

WJ, B. et al. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. **Cardiovasc.Pathol.**, v. 8 , n. 6, p. 305–314, 1999.